

# **Intrazerebroventrikuläre Enzymersatztherapie der metachromatischen Leukodystrophie**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Debora Kaminski**

aus

Bonn

Bonn, 2014

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. V. Gieselmann
2. Gutachter: Prof. Dr. W. Witke

Tag der Promotion: 15.09.2014

Erscheinungsjahr: 2014



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>v</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>vii</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>3</b>
2.1 Zelluläre Struktur des Zentralnervensystems . . . . .	3
2.2 Endozytose, Lysosomen und die Sortierung saurer Hydrolasen . . . . .	4
2.3 Lysosomale Speicherkrankheiten . . . . .	6
2.4 Arylsulfatase A und der Sulfatidmetabolismus . . . . .	7
2.5 Metachromatische Leukodystrophie . . . . .	8
2.6 Mausmodelle zur MLD . . . . .	9
2.7 Therapieansätze . . . . .	10
2.8 Therapieansatz dieser Arbeit . . . . .	11
<b>3 Material</b>	<b>13</b>
3.1 Chemikalien und Laborgeräte . . . . .	13
3.2 Immunzytochemie . . . . .	14
3.2.1 Primärantikörper . . . . .	14
3.2.2 Sekundärantikörper . . . . .	15
3.3 Zellkulturmedien und -Lösungen . . . . .	16
<b>4 Methoden</b>	<b>19</b>
4.1 Intrazerebroventrikuläre Enzyersatztherapie . . . . .	19
4.1.1 Behandlung der Mäuse . . . . .	19
4.1.1.1 Charakterisierung der verwendeten Mausstämme . . . . .	19
4.1.1.2 Vorbereitung der osmotischen Minipumpen zur Implantation	20
4.1.1.3 Implantation der osmotischen Minipumpe . . . . .	20
4.2 Charakterisierung der behandelten Mäuse . . . . .	21
4.2.1 Intrakardiale Perfusion von Mäusen . . . . .	21
4.2.2 Histologische Analytik . . . . .	22
4.2.2.1 Vibratomschnitte von Glutaraldehyd fixierten Mäusen . . . .	22

4.2.2.2	Alzianblau-Färbung . . . . .	22
4.2.2.3	Immunhistochemische Färbung von PFA-fixierten Gefrierschnitten . . . . .	23
4.2.3	Biochemische Analytik . . . . .	24
4.2.3.1	Herstellen von Gewebehomogenaten . . . . .	24
4.2.3.2	Proteinbestimmung . . . . .	25
4.2.3.3	ELISA . . . . .	25
4.2.3.4	Vorbehandlung von Pansorbin . . . . .	25
4.2.3.5	Immunpräzipitation . . . . .	27
4.2.3.6	ASA- und $\beta$ -Hexosaminidase ( $\beta$ -Hex)-Aktivitätstest . . . . .	27
4.2.3.7	Bestimmung des ASA-Antikörper Titer von Serum . . . . .	28
4.2.3.8	Lipidextraktion von Gangliosiden und Sulfatiden . . . . .	29
4.2.3.9	Dünnschichtchromatographie und Auswertung . . . . .	30
4.2.4	Verhaltensanalyse . . . . .	30
4.3	Arbeiten mit adhärenenten Zellen . . . . .	32
4.3.1	Beschichtung von Zellkulturgefäßen . . . . .	32
4.3.2	Einfrieren von Zellen . . . . .	32
4.3.3	Auftauen von Zellen . . . . .	32
4.3.4	Passagieren von adhärenenten Zelllinien . . . . .	32
4.3.5	Bestimmung der Zellzahl . . . . .	33
4.3.6	Isolation von primären Zellen . . . . .	33
4.3.6.1	Isolation von primären, neuronalen Mischkulturen . . . . .	33
4.3.6.2	Isolation von primären Mikroglia . . . . .	34
4.3.6.3	Isolation von primären Astrozyten . . . . .	34
4.3.6.4	Isolation von primären Oligodendrozyten-Vorläuferzellen . . . . .	34
4.3.6.5	Isolation von primären hippokampalen Neuronen . . . . .	37
4.3.7	Fütterung mit rhASA für Endozytose Versuche und Herstellung von Homogenaten . . . . .	38
4.3.8	Fixierung von Zellen mit Paraformaldehyd . . . . .	39
4.3.9	Fixierung von Zellen mit Methanol . . . . .	39
4.3.10	Immunzytochemische Färbung . . . . .	39
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>41</b>
5.1	Charakterisierung der behandelten Mäuse . . . . .	41
5.1.1	Nebeneffekte von i.z.v. EET . . . . .	41
5.1.2	Stabilität der rhASA in osmotischen Minipumpen . . . . .	42
5.1.3	Ermittlung der rhASA Verteilung im Gewebe über Aktivitätsmessungen der Homogenate einzelner Regionen . . . . .	42
5.1.4	Halbwertszeit der rhASA im Gewebe . . . . .	43

5.1.5	Ermittlung der rhASA Verteilung im Gewebe mittels Immunhistochemie	43
5.1.6	Zellspezifische Aufnahme und lysosomale Sortierung der rhASA . . .	45
5.1.7	Detektion des Speichermaterials Sulfatid mittels Alzianblau-Färbung .	47
5.1.8	Lipidanalytik mittels Dünnschichtchromatografie . . . . .	49
5.2	Endozytosefähigkeit primärer, muriner Gehirn-Zellen . . . . .	50
5.2.1	Untersuchung der Endozytose von rhASA in primären, neuronalen Misch- kulturen des Gehirns . . . . .	51
5.2.2	Endozytose von rhASA in primäre Mikroglia . . . . .	54
5.2.3	Endozytose von rhASA in Astrozyten . . . . .	57
5.2.4	Endozytose von rhASA in primäre Neurone . . . . .	59
5.2.5	Endozytose von rhASA in primäre Oligodendrozyten-Vorläuferzellen .	60
5.2.6	Endozytose von rhASA in differenzierte und undifferenzierte Oli- <i>neu</i> - Zellen . . . . .	65
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>
6.1	Intrazerebroventrikuläre Enzymersatztherapie mittels osmotischer Minipumpen	67
6.2	Zelltypspezifische Unterschiede der Endozytose . . . . .	76
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>91</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>95</b>
8.1	Klonierung und Analytik muriner ASA . . . . .	95
8.1.1	Biochemische Analytik von mASA-2 x Strep . . . . .	98
8.2	Transfer radioaktiv markierter ASA in einer Ko-Kultur . . . . .	100
	<b>Lebenslauf</b>	<b>102</b>
	<b>Publikationen</b>	<b>104</b>
	<b>Erklaerung</b>	<b>106</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>108</b>

# Abbildungsverzeichnis

2.1	Differenzierung . . . . .	4
2.2	Sulfatidmetabolismus . . . . .	7
2.3	Osmotische Minipumpe . . . . .	11
4.1	Maus mit Pumpe . . . . .	21
4.2	Schrittparameter . . . . .	31
5.1	ASA-Verteilung im Gehirn . . . . .	42
5.2	rhASA im Gewebe . . . . .	44
5.3	Lysosomale Sortierung . . . . .	45
5.4	Ko-Färbung ASA mit Zellmarkern . . . . .	46
5.5	Alzianblau-Färbung . . . . .	48
5.6	Lipidanalytik . . . . .	50
5.7	Ko-Färbung von ASA und Zellmarkern in einer Mischkultur . . . . .	52
5.8	Endozytose nach MPR300 Konkurrenz in Mikroglia einer Mischkultur . . . . .	54
5.9	Mikroglia auf Mischkultur . . . . .	55
5.10	Mikroglia Reinheit . . . . .	56
5.11	Endozytose Mikroglia . . . . .	56
5.12	IZC primärer Astrozyten . . . . .	57
5.13	IZC 17 <sup>-/-</sup> A1 . . . . .	58
5.14	Endozytose von 17 <sup>-/-</sup> A1-Zellen . . . . .	58
5.15	IZC primärer Neurone . . . . .	59
5.16	ASA-Aufnahme in primäre Neurone . . . . .	60
5.17	NG2 und GFAP an OVZ . . . . .	61
5.18	IZC OVZ . . . . .	62
5.19	Differenzierung OVZ . . . . .	63
5.20	Endozytose in OVZ . . . . .	64
5.21	Differenzierung Oli-neu-Zellen . . . . .	65
5.22	Endozytose in Oli-neu-Zellen . . . . .	66
6.1	Analyse des Schrittmusters . . . . .	75
6.2	Vergleich rhASA Aufnahme . . . . .	78

8.1	Vektorkarte und Schema von mASA-His/Strep . . . . .	97
8.2	Vektorkarte und Schema von mASA-2 x Strep . . . . .	98
8.3	Oktamerisierung . . . . .	99
8.4	Deglykosylierung . . . . .	100
8.5	Radioaktiver Transferversuch . . . . .	101

# Tabellenverzeichnis

3.1	Laborgeräte . . . . .	13
3.2	Primärantikörper . . . . .	14
3.3	Sekundärantikörper . . . . .	15
3.4	Zelllinien und Medien . . . . .	16
4.1	Mauslinien . . . . .	20
4.2	ELISA . . . . .	26
4.3	Pansorbin . . . . .	26
4.4	Immunpräzipitation . . . . .	27
8.1	Vektoren . . . . .	95
8.2	Primer . . . . .	96

# 1 Zusammenfassung

Die metachromatische Leukodystrophie (MLD) ist eine autosomal rezessiv vererbte lysosomale Speicherkrankheit. Diese wird durch einen Gendefekt der Arylsulfatase A (ASA) verursacht, welche den ersten Schritt in der Degradation des Sphingolipids Sulfatid katalysiert. Die Defizienz dieses Enzyms verursacht eine intralysosomale Speicherung von Sulfatid. Durch die Akkumulation von Sulfatid im ZNS und PNS kommt es zur Degeneration der Myelinscheiden. Patienten leiden an einer progressiven Demyelinisierung, schweren neurologischen Symptomen und erleiden einen frühen Tod.

Eine Heilung für die MLD gibt es bisher nicht. Therapieansätze beschränken sich u.a. auf die Enzymersatztherapie (EET). Hierbei wird rekombinante, humane ASA (rhASA) per Injektion lebenslänglich, zugeführt. Die meisten lysosomalen Enzyme werden aufgrund ihrer Markierung mit Mannose-6-Phosphat (M6P) von Zellen aufgenommen und in die Lysosomen transportiert. An Mausmodellen der MLD führte eine intravenöse Injektion der rhASA nur zu einer sehr geringen Abnahme der Sulfatidspeicherung im ZNS. Um eine stärkere Abnahme zu erzielen wurden, im Rahmen dieser Arbeit, für eine intrazerebroventrikuläre EET (i.z.v. EET) osmotische Minipumpen in Mausmodelle der MLD implantiert. Diese applizierten rhASA direkt in den lateralen Ventrikel.

Sechs Monate alte MLD-Mausmodelle weisen ein asynchrones Schrittmuster mit breiterem Gang und erhöhter Schrittlänge auf welches durch i.z.v EET verbessert werden konnte. Immunzytochemische Analysen zeigten eine breite Verteilung der rhASA im gesamten Gehirn nach Behandlung. Die Konzentration der rhASA im Gehirn war geringer mit größer werdendem Abstand zur Injektionsstelle. Die infundierte rhASA wurde von verschiedenen neuronalen Zelltypen endozytiert und in das lysosomale Kompartiment sortiert. Histologische und biochemische Analysen zeigten eine erhebliche Abnahme des Speichermaterials. Es zeigten sich zelltypspezifische Unterschiede im Therapieerfolg. In Phagozyten wurde, im Gegensatz zu Neuronen, das Speichermaterial auch in weiter entfernten Regionen von der Injektionsstelle degradiert. Zellkulturexperimente zeigten, dass primäre, neuronale Zelltypen, wie Neurone und Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OVZ), sowie eine astrogliale, ASA-defiziente Zelllinie (17  $-/-$  A1) extrazellulär hinzugefügte ASA M6P-abhängig endozytierten. OVZ zeigten dabei genotypspezifische Unterschiede: OVZ aus ASA $^{-/-}$ -Mäusen nahmen weniger rhASA auf als OVZ aus WT Mäusen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Mikroglia ASA über verschiedene Rezeptoren, wie dem M6P-, dem Mannose- und dem *scavenger*-Rezeptor, aufnahmen. Sowohl im Tiermodell als auch *in vitro* konnte die Aufnahme der applizierten rhASA in ver-

schiedenen Zelltypen nachgewiesen werden. Die i.z.v. EET bietet demnach einen vielversprechenden Therapieansatz für MLD.

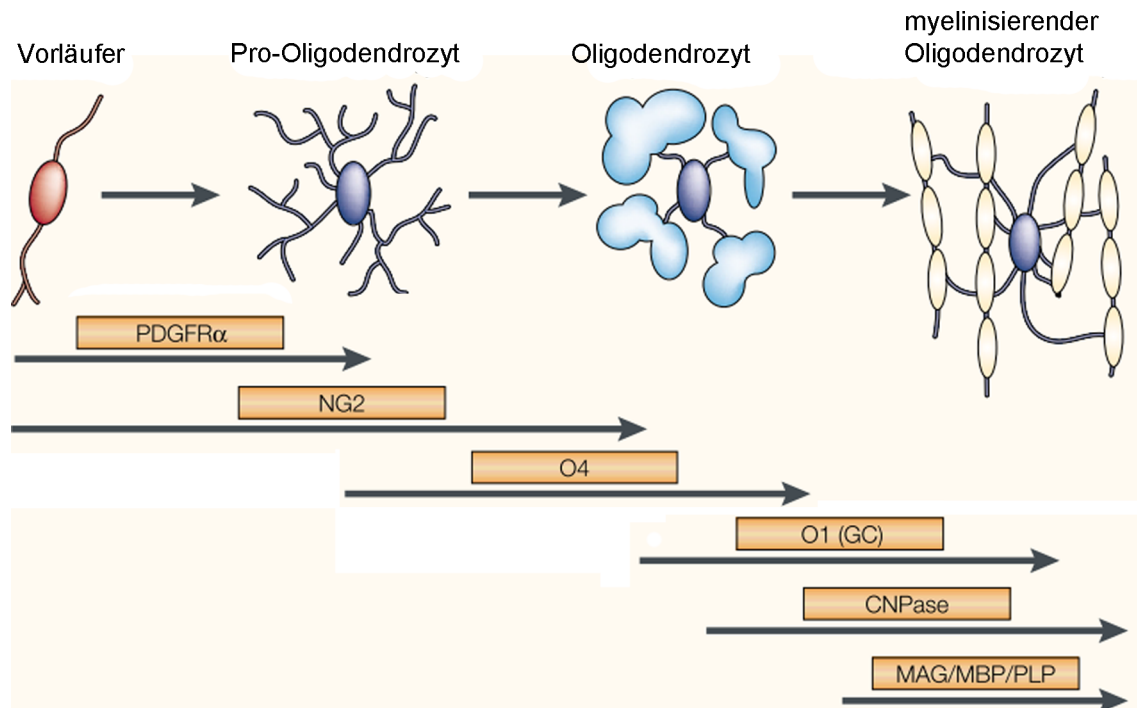


## 2 Einleitung

### 2.1 Zelluläre Struktur des Zentralnervensystems

Die Nervensysteme aller Wirbeltiere weisen eine Übereinstimmung auf: sie besitzen ein zentrales (ZNS) und ein davon abgrenzbares peripheres Nervensystem (PNS). Bei allen Wirbeltieren besteht das ZNS aus Rückenmark und Gehirn, während das PNS alle neuronalen Anteile außerhalb des ZNS umfasst. Auf der zellulären Ebene sind im ZNS neben Neuronen auch Gliazellen zu finden. Neurone zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, elektrische Signale in Form von Potentialen weiterzuleiten. Zur Identifikation von Neuronen kann  $\beta$ III-Tubulin, ein neuronenspezifischer Bestandteil der Mikrotubuli, dienen. Auch NeuN (*neuronal nuclei*), ein Transkriptionsfaktor, dient als Marker für Neurone. Er kommt hauptsächlich im Zellkern vor, aber auch im Zytoplasma in direkter Nähe zum Zellkern [129]. Gliazellen werden in Makro- und Mikroglia unterteilt. Zu den Makroglia zählen Astrozyten und Oligodendrozyten. Astrozyten, welche die Mehrheit aller Gliazellen bilden, zeichnen sich durch ihre sternförmige Morphologie aus. Das Astrozyten spezifische gliale fibrilläre azide Protein (GFAP), ein Grundbestandteil der Intermediärfilamente von Astrozyten, wird zur immunzytochemischen Färbung der Astrozyten genutzt. Die Intermediärfilamente sorgen für die mechanische Stabilität, wodurch Astrozyten eine Stützfunktion im ZNS übernehmen, die in anderen Organen durch das Bindegewebe erfüllt wird [69], [2]. Durch Kontakte, sowohl zu Blutgefäßen als auch zu Neuronen, versorgen die Astrozyten die Neurone mit Nährstoffen [2]. Oligodendrozyten besitzen kleine, runde Zellkerne und wenig verzweigte Zellfortsätze. Ihre Hauptaufgabe ist die elektrische Isolierung der neuronalen Axone durch Myelin, wodurch eine Beschleunigung der Erregungsweiterleitung gewährleistet wird. Myelin stellt eine mehrschichtige Verlängerung der Plasmamembran von Oligodendrozyten (ZNS) bzw. Schwannzellen (PNS) dar. Die sehr gute elektrische Isolierung eines Axons wird durch die einzigartige, lipidreiche Zusammensetzung der Myelinscheide gewährleistet. Die Membranen von Oligodendrozyten und des Myelins bestehen zu 70 % aus Lipiden und zu 30 % aus Proteinen. Eine der Hauptcharakteristiken von Oligodendrozyten und Myelin ist die Reichhaltigkeit an Glykosphingolipiden. Galaktosylceramid macht dabei etwa 20 % des gesamten Lipidgehaltes aus und Sulfatid vier bis sechs Prozent [7], [89]. Die Proteinzusammensetzung reifer Oligodendrozyten und des Myelins entwickelt sich erst während der Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OVZ). Diese ist u.a. durch eine morphologische Veränderung charakterisiert. Bipolare OVZ transformieren zu Pro-Oligodendrozyten mit multiplen Fortsätzen, dann zu reifen Oligodendrozyten und schließlich zu myelinisierenden

den Oligodendrozyten. Zusätzlich durchlaufen sie einen koordinierten Wechsel der Expression von Oberflächenmarkern. OVZ exprimieren u.a. das Chondroitinsulfat Proteoglykan NG2, reife Oligodendrozyten Myelin-Proteine wie das *myelin basic protein* (MBP) und das Proteolipid Protein (PLP) (siehe Abb. 2.1) [131].



**Abbildung 2.1: Differenzierungsmarker von Oligodendrozyten.**

Verschiedene Stadien der Oligodendrozytendifferenzierung und Expression verschiedener Antigene während der Differenzierung. Modifiziert nach Zhang *et al.* 2001 [131].

Allerdings wird NG2 nicht nur von OVZ exprimiert, sondern auch von Perizyten, welche mit Blutgefäßen des ZNS assoziiert sind. Zusätzlich differenzieren einige NG2-positive Zellen während der Embryonalentwicklung zu Astrozyten [102], [98].

Mikroglia leiten sich aus Knochenmarksvorläufern ab, die aus der Peripherie in das ZNS migrieren [100]. Tritt eine pathologische Veränderung ein, gehen sie in den aktiven, amoeboiden Zustand über. In diesem phagozytieren sie Zelltrümmer, apoptotische Zellen und Mikroben und erfüllen somit ihre Aufgabe als Immunzellen des ZNS. F4/80 wird als Marker mikroglialer Zellen verwendet.

## 2.2 Endozytose, Lysosomen und die Sortierung saurer Hydrolasen

Lysosomen, membranbegrenzte Organellen tierischer Zellen, übernehmen eine Hauptaufgabe in der Degradation von Makromolekülen durch saure Hydrolasen, wie Proteasen, Lipasen und Nukleasen. Das Lumen der Lysosomen wird von einer ATPase des V-Typs azidifi-

ziert [97], so dass lysosomale Hydrolasen mit ihrem pH-Optimum von 4,5-5 dort ideale Bedingungen vorfinden. Lösliche lysosomale Proteine werden als Vorläufer-Polypeptide synthetisiert und tragen eine bis zu 25 Aminosäure lange N-terminale Sequenz, welche eine kotranslationale Translokation in das Lumen des ER bewirkt. Anschließend wird das Signalpeptid abgespalten und vorgefertigte Oligosaccharide ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) auf bestimmte Asparaginereste transferiert (N-Glykosylierung). Durch verschiedene Enzyme werden die Glukosereste entfernt und es entstehen *high*-Mannose-Typ Oligosaccharide [94]. Über vesikulären Transport gelangen die Proteine dann in das prä-Golgi-Kompartiment. In diesem werden Phosphatreste an *high*-Mannose-Typ Oligosaccharide angehängen. Die dadurch entstehenden Mannose-6-Phosphatreste (M6P) dienen als lysosomales Lokalisierungssignal. Zwei Enzyme katalysieren die Generierung der M6P-Reste: *UDP-N-acetylglucosamin (UDP-GlcNAc):lysosomal enzyme N-acetylglucosamine-1-phosphotransferase* (GlcNAc-1-Phosphotransferase) und *N-acetylglucosamine-1-phosphodiester  $\alpha$ -N-acetylglucosaminidase (uncovering enzyme, UCE)*. Zunächst überträgt die GlcNAc-1-Phosphotransferase ein GlcNAc-1-Phosphat von UDP-GlcNAc auf die C6 Hydroxylgruppe der Mannose. Das N-Acetylglucosamin wird anschließend durch das UCE hydrolytisch abgespalten und das M6P wird exponiert [16]. Abhängig von der lysosomalen Hydrolase und dem Zelltyp können, nach *trimming* durch eine Golgi-Mannosidase und dem Transfer verschiedener Reste (Galaktose, Fukose oder Sialinsäure) auf GlcNAc, komplexe oder hybride Zuckerketten entstehen [94].

Die M6P-Reste werden durch M6P-spezifische Rezeptoren (MPR) im Trans-Golgi-Kompartiment (TGK) erkannt. Es sind zwei MPR bekannt, der Kationen-unabhängige MPR300 mit einer molekularen Masse von 300 kDa und der Kationen-abhängige MPR46 mit einer Masse von 46 kDa. Sie unterscheiden sich in ihrem Expressionslevel, der Gewebeverteilung und den Ligandenbindungseigenschaften [94]. MPR sind Typ-I-Transmembran-Glykoproteine, welche Clathrin-abhängig die Sortierung saurer Hydrolasen in die Lysosomen vermitteln. Ein geringer Anteil neu synthetisierter lysosomaler Proteine (5-20 %) entgeht der lysosomalen Sortierung und wird sezerniert [22]. Durch MPR300 auf der Zelloberfläche (etwa 3-10 % des totalen zellulären MPR) werden diese wieder eingefangen [16]. Die gebildeten Komplexe aus MPR und lysosomalen Hydrolasen verlassen in Clathrin-umhüllten Vesikeln das TGK und fusionieren anschließend mit endosomalen Strukturen. Aufgrund des dort niedrigen pH-Wertes (pH 5,5) dissoziieren die Hydrolasen von dem MPR. Der MPR wird zum TGK zurückgeführt und kann wiederverwertet werden, während die Hydrolasen zu den Lysosomen transportiert werden. Studien an Mäusen, denen beide MPR fehlen, konnten zeigen, dass einige lysosomale Hydrolasen zelltypspezifisch einen MPR-unabhängigen Weg zur lysosomalen Sortierung besitzen [31], [58].

Der Mannose-Rezeptor, ein C-Typ Lektin Rezeptor, wird hauptsächlich auf von Monozyten stammenden dendritischen Zellen und Makrophagen/Mikroglia exprimiert. Nach Bindung der Glykoproteine von Pathogenen an den Mannose-Rezeptor werden diese über Phagozytose oder Endozytose zur anschließenden proteolytischen Degradation zum Lysosom gebracht. Somit übernehmen Mannose-Rezeptoren eine wichtige Aufgabe in der angeborenen Immunant-

wort [62]. Mannose oder Mannan enthaltene Liganden sowie Glykoproteine werden von den Mannose-Rezeptoren erkannt [55].

Eine weitere Familie von Rezeptoren, über die Makromoleküle in Zellen gelangen können, sind die *scavenger*-Rezeptoren. *Scavenger*-Rezeptoren werden, basierend auf ihrer Struktur und Eigenschaft modifiziertes *Low Density Lipoprotein* (LDL) zu binden und zu internalisieren, eingeteilt. Klasse A *scavenger*-Rezeptoren bestehen hauptsächlich aus zwei Mitgliedern: *Scavenger*-Rezeptor Klasse A I (SRAI) und der Makrophagen-Rezeptor mit Kollagenase-Domäne (MARCO). Beide werden hauptsächlich von Makrophagen exprimiert, wohingegen andere Vertreter der Familie weitestgehend auf vielen Zelltypen exprimiert werden, wie z.B. auf epithelialen Zellen, Zellen der Plazenta oder auf Hepatozyten [127], [43]. *Scavenger*-Rezeptoren erkennen jedoch nicht nur modifiziertes LDL, sondern auch andere negativ geladenen Makromoleküle [125]. Klasse A *scavenger*-Rezeptoren werden durch Dextran-Sulfat kompetitiv inhibiert [123]. Dextran-Sulfat konkurriert mit oxidiertem *Low Density Lipoprotein* (LDL) um die Bindung an die *scavenger* Rezeptoren.

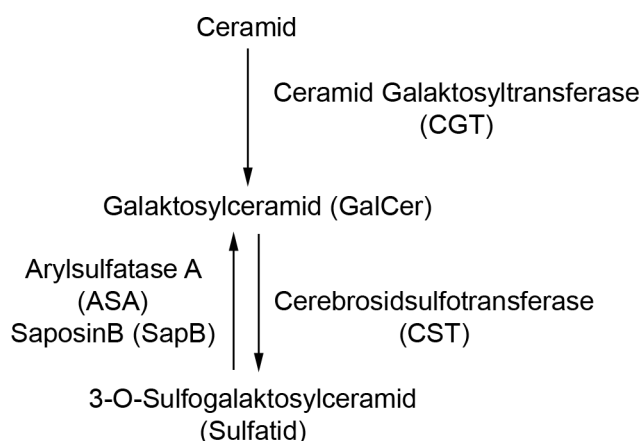
## 2.3 Lysosomale Speicherkrankheiten

Lysosomale Speicherkrankheiten (*lysosomal storage disease*, LSD) gehören zu einer Gruppe von Krankheiten, in denen es zu metabolischen Störungen kommt. Die Ursache sind Mutationen in Genen, welche für die Funktion der Lysosomen essentiell sind. Eine Folge dieser Mutationen sind lysosomale Substratakkumulationen. Zu den betroffenen Proteinen gehören lysosomale Hydrolasen, lysosomale integrale Membranproteine und Proteine, die für die posttranslationale Modifikation lysosomaler Hydrolasen oder deren Sortierung zuständig sind. Es gibt über 50 verschiedenen LSDs mit einer Gesamthäufigkeit aller lysosomaler Speicherkrankheiten von etwa 1 in 8000 Geburten. Alle haben einen progredienten Krankheitsverlauf [109]. LSDs sind monogen, allerdings können verschiedene Mutationen des selben Gens in unterschiedlichen Patienten auftreten. Manche Mutationen führen dabei zu einem kompletten Verlust enzymatischer Aktivität, wohingegen andere lediglich die Aktivität reduzieren [40]. Aufgrund des anfallenden Speichermaterials werden LSDs u.a. in Mukopolysaccharidosen, Sphingolipidosen und Oligosaccharidosen unterteilt. Bei Mukopolysaccharidosen (MPS) akkumulieren verschiedene Proteoglykane oder Glykosaminoglykane je nach defektem Enzym. Dies führt bei MPS u.a. zu Knorpelschäden, was zusätzlich zu reduziertem Knochenwachstum führt [6]. Die Substrate lysosomaler Hydrolasen sind zelltypabhängig verteilt. Abhängig vom defizienten Enzym sind deshalb unterschiedliche Organsysteme betroffen [93]. Über zwei Drittel aller LSDs haben eine Beteiligung des ZNS und führen meist zum Tod der Patienten [109].

## 2.4 Arylsulfatase A und der Sulfatidmetabolismus

3-O-Sulfogalaktosylceramid (Sulfatid) kommt insbesondere im Myelin des ZNS und PNS vor. Die Synthese des Sulfatids beginnt mit der Addition von UDP-Galaktose auf Ceramid an der luminalen Seite des ERs durch die Ceramidgalaktosyltransferase (CGT) (siehe Abb. 2.2). Das entstandene Galaktosylceramid (GalCer) wird zum Golgi-Apparat transportiert. Im TKG überträgt die Cerebrosidsulfotransferase (CST) eine Sulfatgruppe von 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS) auf Galaktosylceramid. Sulfatid ist eine Hauptkomponente der Myelinscheide und auf deren Außenseite lokalisiert. Bevor Axone myelinisiert werden wird die Synthese von Sulfatid in Oligodendrozyten hochreguliert. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass Sulfatid nicht nur eine strukturelle Komponente von Myelin darstellt [33].

Die Degradation von Sulfatid wird in den Lysosomen durch die Arylsulfatase A (ASA) mithilfe des Sphingolipid Aktivatorproteins Saposin B katalysiert. Da Sulfatid nicht zugänglich für die ASA ist extrahiert Saposin B Sulfatid aus der äußeren Membran und stellt es der löslichen ASA zur Verfügung [57]. Defizienz von ASA oder dem Aktivatorprotein Saposin B führt zu einer schweren LSD, der metachromatischen Leukodystrophie (MLD). Bei einer Saposin B Defizienz treten zusätzlich zu Sulfatid weitere Speichersubstanzen auf, da Saposin B auch andere Glykosphingolipidsubstrate aktiviert [119].



**Abbildung 2.2: Sulfatidmetabolismus: Synthese und Degradation.**

Durch die CGT wird ein Galaktoserest an Ceramid angefügt. Dieser wird durch die CST sulfatiert. Mithilfe des Aktivatorproteins Saposin B (SapB) desulfatiert die ASA das entstandene Sulfatid. Modifiziert nach Takahashi *et al.* 2012 [120].

Kodiert wird die 507 Aminosäuren lange humane ASA von einem 3,2 kb langen Gen, bestehend aus acht Exonen [59]. Die ersten 18 Aminosäuren am N-Terminus dienen als Signalpeptid für den ER Import. Nach Abspaltung des Signalpeptids verbleiben 489 Aminosäuren. Damit erreicht die ASA ein theoretisches Molekulargewicht von 51,7 kDa [116]. Aufgrund diverser Modifikationen ist die ASA bei SDS-Polyacrylamid elektrophoretischer Auftrennung bei 61 kDa detektierbar. Glykosyliert ist die ASA an Asn158, Asn184 und Asn350 [115]. Endoglukosaminase H-Behandlung der ASA verursacht eine Verschiebung von 61 kDa zu 57 kDa, was auf Gly-

kosylierungsstellen mit N-glykosidisch verknüpften Oligosacchariden des *high*-Mannose-Typ hinweist. Mannosereste von Asn158 und Asn350 werden unter der Bildung von M6P phosphoryliert.

Im aktiven Zentrum an Stelle 69 ist ein hoch konserviertes Cystein kodiert, welches durch das Formylglycin-generierende Enzym zu einem Aldehyd oxidiert wird, dem Formylglycin.

ASA liegt als Dimer vor, welches unter den aziden Bedingungen der Lysosomen oktamisiert und dadurch stabilisiert wird. Im Oktamer ist die Schnittstelle der ASA-Dimere gegen die lysosomale Cystein-Proteinase Kathepsin L abgeschirmt.

## 2.5 Metachromatische Leukodystrophie

Die metachromatische Leukodystrophie ist eine autosomal rezessiv vererbte lysosomale Speicherkrankheit. Defizienz von ASA führt dazu, dass Sulfatid nicht mehr degradiert wird und lysosomal akkumuliert. Das meiste Sulfatid befindet sich in Oligodendrozyten und Schwannzellen. Sulfatid wurde auch in anderen Geweben, wie dem distalen Tubulus der Nieren oder dem Epithelium der Gallengänge, gefunden. Die Sulfatidspeicherung in myelinisierenden Zellen hat eine große Auswirkung auf das Nervensystem. Im Verlauf der Krankheit ist eine Degeneration der Myelinscheiden und somit ein Rückgang der weißen Substanz zu beobachten, was pathologisch eine farbliche Veränderung des Gehirns zur Folge hat [24]. Durch die Demyelinisierung werden viele neurologische Symptome hervorgerufen, die letztendlich zu einem frühen Tod führen können.

ASA-Defizienz wird durch drei klinische Subtypen charakterisiert: die spät infantile MLD (50-60 % der Fälle), juvenile MLD (20-30 % der Fälle) und adulte MLD (15-20 % der Fälle). Die spät infantile MLD bricht im Alter von ein bis zwei Jahren aus. Bemerkbar macht sich die Krankheit durch Ungeschicklichkeit, Hypotonie der Muskeln und dadurch häufigeres Hinfallen. Im späteren Verlauf folgt die Unfähigkeit zu stehen, mentale Retardierung, undeutliche Sprache, ein erhöhter Muskeltonus, Beeinträchtigung des Hör- und Sehvermögens sowie periphere Neuropathie. Im Endstadium, welches mehrere Jahre dauern kann, leiden die Kinder unter tonischen Spasmen und nehmen ihre Umwelt nicht mehr wahr. Die meisten der Kinder sterben im Alter von fünf Jahren. Die juvenile MLD bricht während der Pubertät aus und hat eine ähnliche Progression wie die spät infantile MLD, sie verläuft aber langsamer. Einige der Patienten erreichen das 20. Lebensjahr. Die Symptome der adulten Verlaufsform beginnen nach Erlangen der sexuellen Reife und können sich über Jahre und Jahrzehnte erstrecken [38].

Über 118 identifizierte Mutationen im ASA Gen führen zu der MLD [20]. Drei davon treten häufiger in Erscheinung. Mutationen, bei denen noch ein Enzym mit Restaktivität gebildet wird, führen entweder zu der juvenilen oder der adulten Form der MLD. Da etwa drei bis fünf Prozent der ASA-Aktivität ausreichen, um Sulfatid zu degradieren, kommt es bei heterozygoten, mit nur einem mutierten Allel, nicht zum Ausbruch der Krankheit. Demnach müssen zum Ausbruch der Krankheit beide Allele betroffen sein [77], [40]. Aufgrund einer ASA-Restaktivität bei ver-

schiedenen Genotypen kann bei der MLD in vielen Fällen eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation beobachtet werden [95].

## 2.6 Mausmodelle zur MLD

Da MLD bisher nur bei Menschen beschrieben wurde und kein natürlich vorkommendes Tiermodell zur Verfügung steht, generierten Hess *et al.* 1996 [46] eine homozygote ASA-knockout-Maus ( $ASA^{-/-}$ ). Biochemisch gesehen weisen  $ASA^{-/-}$ -Mäuse einen Phänotyp auf, welcher der spät infantilen MLD mit einem kompletten Verlust der ASA-Aktivität entspricht. Diese Mäuse speichern Sulfatid in Schwannzellen, den distalen Tubuli der Niere, in der weißen Substanz des Gehirns, und im Gallenblasenepithel, was der humanen Pathologie ähnelt. Die Beeinträchtigung der Neuromotorkoordination, Ataxie, Tremor und hypotonische Parese in den ASA-defizienten Mäusen erinnern an frühe Stadien der MLD. Eine Demyelinisierung kann in den  $ASA^{-/-}$ -Mäusen nicht nachgewiesen werden. Allerdings treten Astroglieose und eine Aktivierung der Mikroglia auf. Trotz Speicherung und neurologischer Symptome zeigen die Mäuse keine verringerte Lebenserwartung. Es wurde gezeigt, dass die Halbwertszeit von Sulfatid in Myelin etwa sechs Monate beträgt [53]. Demnach scheint die Akkumulation von Sulfatid ein langsamer Prozess zu sein, der einige Monate bis zu einem Jahr dauern kann. Durch die generell kurze Lebensdauer einer Maus ist die Akkumulation von Sulfatid nicht in dem Ausmaß vorhanden, dass eine Demyelinisierung eintritt, was den milden Phänotyp erklären könnte. Um eine Verstärkung des Phänotyps zu erreichen wurden transgene Mäuse erzeugt, welche die CST überexprimieren (im Folgenden  $ASA^{-/-}$  PLP-CST-Mäuse) [99]. Dies führt zu einer gesteigerten Sulfatidsynthese. Unter der Kontrolle des PLP-Promotors wird die CST in Oligodendrozyten und Schwannzellen exprimiert, was zu einer signifikanten Erhöhung des Sulfatidspiegels im Gehirn und dem PNS führt. Dadurch zeigen diese  $ASA^{-/-}$  PLP-CST-Mäuse verstärkte neurologische Symptome, die denen der humanen MLD im fortgeschrittenem Stadium ähneln. Dazu zählen eine progressive Paralyse der hinteren Extremitäten, Muskeldenervierung sowie eine verminderte Nervenleitgeschwindigkeit aufgrund von Demyelinisierung.

Das Fehlen der ASA in MLD-Mäusen führt bei Enzyersatztherapie (EET) (siehe Kap. 2.7) zu einer unerwünschten Immunreaktion [77]. Dies führt zu einer verminderten Verbesserung der Speicherung durch Blockade der M6P-vermittelten Endozytose, Fehlsortierung injizierter, rekombinanter humaner ASA (rhASA) und Verminderung der rhASA Stabilität. Einige MLD-Patienten bilden Antikörper gegen die injizierte rhASA zeigen aber keine der in Mäusen beobachteten Komplikationen [80]. Um einer Immunantwort bei MLD-Mäusen, welche durch EET behandelt werden, vorzubeugen wurde eine inaktive hASA-Mutante kloniert und in MLD-Mäusen heterozygot exprimiert. Bei dieser Mutante wurde Cys69 im aktiven Zentrum der ASA durch ein Serin substituiert. Somit kann Formylglycin nicht mehr generiert werden [79]. Für diese Studie wurde die inaktive hASA sowohl in  $ASA^{-/-}$ - aber auch in  $ASA^{-/-}$  PLP-CST-Mäusen exprimiert.

## 2.7 Therapieansätze

Lysosomalen Speichererkrankungen sind bis heute nicht heilbar. Bisher gelang es nur Morbus Gaucher Typ I erfolgreich mittels EET zu behandeln [44] [85]. EET wird durch die Möglichkeit der Kreuzkorrektur zwischen Zellen ermöglicht [39], [86]. Diese beruht auf der Fähigkeit lysosomaler Enzyme an Rezeptoren, meist MPR300, an der Plasmamembran zu binden und von der Zelle endozytiert zu werden. Ein ASA-Transfer durch direkten Zell-Zell Kontakt bei Fibroblasten oder monozytären Zellen konnte *in vitro* beobachtet werden [106], [14]. Experimente an mit Sulfatid beladenden Fibroblasten von Patienten mit spät infantiler MLD zeigten, dass das Enzym aus dem Medium endozytiert und das akkumulierte Material lysosomal degradiert wurde [96]. Extrazellulär vorhandenes Enzym kann hierbei von gleichen oder benachbarten Zellen stammen oder von außen hinzugefügt werden. Morbus Gaucher ist die erste LSD die durch EET behandelt wurde. Dabei wurde aus humaner Plazenta gewonnene Alglukerase eingesetzt. Alle folgenden EET Produkte wurden in Zellkultursystemen hergestellt [15]. Bei Morbus Gaucher ist die Speicherung von Glukosylceramid hauptsächlich in Zellen des Makrophagen/Monozyten- und des Retikuloendothelialsystems zu finden und es liegt keine Beteiligung des ZNS vor.

EET hat keinen Effekt auf LSDs mit zentralnervöser Beteiligung, da die in die Blutbahn injizierten Enzyme die Bluthirnschranke (BHS) nicht überwinden können. Die BHS ist eine selektiv durchlässige Barriere zwischen dem ZNS und dem Blutstrom. Ihre Hauptaufgabe ist es, den Stoffaustausch zwischen Blut und Gehirn streng zu kontrollieren und damit die Gehirn-Homöostase aufrecht zu erhalten. Sie wird von Endothelzellen gebildet, welche die Wände der Kapillare auskleiden. Die Endothelien sind über Zell-Zell-Verbindungen, den *tight junctions*, miteinander verbunden. Sie unterbinden den parazellulären Transport von wasserlöslichen Stoffen fast vollständig [1].

In Mäusen wurde bereits gezeigt, dass Abkömmlinge der hämatopoetische Stammzellen über die BHS in das ZNS migrieren können [4], [17], [87]. Basierend auf dieser Begründung wurden viele Patienten mit Knochenmarkstransplantation (KMT) hämatopoetischer Stammzellen (HSZ) behandelt. Dabei konnte in der Studie von Smith *et al.* 2010 keine Verbesserung der Symptome erzielt werden [113]. Navarro *et al.* und Kapaun *et al.* erreichten lediglich eine Verzögerung der Symptome und keine Heilung [84], [54].

Bei der *ex vivo* Gentherapie werden autologe hämatopoetische Stammzellen des Patienten mit dem Gen transfiziert oder transduziert, in das Knochenmark transplantiert und so dem Organismus zur Verfügung gestellt [8].

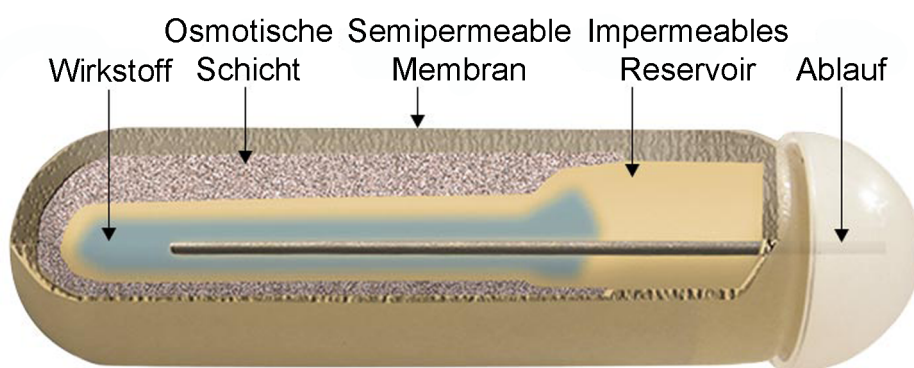
Für weitere Therapieansätze wird ausgenutzt, dass bei manchen Mutationen (z.B. Pro426Leu) die ASA enzymatisch aktiv ist. Allerdings ist das Prolin an Stelle 426 an dem Oktamerisierungsprozess beteiligt welcher bei dieser Mutation nicht mehr stattfinden kann. Demnach ist die Kathepsin L Schnittstelle freigelegt und die ASA wird degradiert. Eine Stabilisation des Enzyms durch Inhibitoren der Kathepsin L Protease ist demnach ein möglicher Therapieansatz [18]. Einen neuen Ansatz bietet die Chaperontherapie. Dabei können kompetitive Enzyminhibitoren



(*active-site-specific-chaperons* (ASSC)) die korrekte Faltung unterstützen, wenn sie in nicht-inhibitorischen Konzentrationen verabreicht werden [35]. Die Reduktion des Substrates durch Inhibition der CST (Substratreduktionstherapie) [61] stellt einen weiteren Ansatz zur Therapie der MLD dar.

## 2.8 Therapieansatz dieser Arbeit

Die Transferrate von ASA über die BHS ist sehr niedrig, weshalb eine hohe Enzymdosis bei der EET benötigt wird, um eine therapeutisch effektive Konzentration im ZNS zu erreichen [73]. Da die Herstellung sehr kostenintensiv ist, wird eine Methode benötigt, bei der die BHS erfolgreich umgangen werden kann. Die zerebrale Injektion mittels osmotischer Minipumpen ist eine Methode, um die BHS zu umgehen [121]. Zur Anwendung an Tieren wurden osmotische Minipumpen von ALZET verwendet, welche den Wirkstoff über einen osmotisch gesteuerten Prozess abgeben. Die kommerziell erhältlichen osmotischen Minipumpen für Mäuse werden subkutan implantiert. Das durch die semipermeable Membran in die osmotische Schicht einströmende Gewebewasser bewirkt eine Kompression des Wirkstoff-enthaltenden, inpermeablen Reservoirs (siehe Abb. 2.3). Dies führt zum Ausströmen des Wirkstoffes durch den Ablauf über eine Kanüle in das Ventrikelsystem des Gehirns. Die abgegebene Rate des zu befördernden Wirkstoffes wird durch die Permeabilität der äußeren Membran der Minipumpe bestimmt. Da die osmotische Salzschrift für das Einströmen des Wassers verantwortlich ist, ist die Wirkungsweise der osmotischen Minipumpe unabhängig von der Zusammensetzung des Wirkstoffes [122].



**Abbildung 2.3: Schematischer Querschnitt einer osmotischen Minipumpe von ALZET.**

Nach Implantation osmotischer Minipumpen führt einströmendes Gewebewasser durch die semipermeable Membran in die osmotische Schicht zu einer Kompression des Wirkstoff-enthaltenden, impermeablen Reservoirs. Dadurch strömt der Wirkstoff durch den Ablauf über eine Kanüle in das Ventrikelsystem des Gehirns.

Pumpen finden auch Anwendung beim Menschen, z.B. für eine intrathekale Injektion (in den Raum zwischen Arachnoidea und Pia mater, den Subarachnoidalraum) von Opioiden bei

Patienten mit chronischen Schmerzen [112]. Daher wäre eine Administration der ASA mittels osmotischer Minipumpen eine kostengünstige Alternative, die BHS zu umgehen, um eine therapieeffiziente Menge an ASA dem ZNS bereitzustellen.

# 3 Material

## 3.1 Chemikalien und Laborgeräte

Sofern nicht anders erwähnt, wurden die Chemikalien bei Sigma Aldrich, Carl Roth, Fermentas, Pierce/Thermo Fisher oder Merk in Analysequalität (p.a.) bestellt. Glasgefäße wurden von Schott bezogen. Zellkulturgefäße und Zellkulturverbrauchsmaterialien stammten von den Firmen Sarstedt und Becton-Dickinson. Medien für die Zellkultur wurden bei Gibco/Invitrogen bestellt.

Tabelle 3.1: Die in der Arbeit verwendeten Laborgeräte.

Gerät, Model	Hersteller
<i>Automatic TLC Sampler 4 (ATS 4)</i>	CAMAG
Axioskop 2 mot	Zeiss
Axiophot	Zeiss
FLA-5100 Fluoreszenz Scanner	Fujifilm Life Science
Kryostat, Leica CM 3050	Leica
Mikroplattenleser, GENios mit Software Magellan	Tecan
Mikroplattenwascher, HydroFlex	Tecan
Szintillationszähler LS 6500	Beckman Coulter
Vibratom, VT 1200S	Leica
Zählkammer, Neubauer	Brand GmbH & Co. KG

## 3.2 Immunzytochemie

### 3.2.1 Primärantikörper

**Tabelle 3.2:** Verwendete Primärantikörper in dieser Arbeit.

IHC = Immunhistochemie, WB = Western Blot; PFA = Paraformaldehyd; LAMP2 = *Lysosome-associated membrane protein 2*

Antigen	Wirt	IHC/WB	Fabrikant	Bestellnummer
humane ASA (19-16-3)	Maus	0,125 $\mu$ g	-	Eigenherstellung
humane ASA (BE#3)	Kaninchen	1 zu 2000	Eurogentec	-
humane ASA (PFA-affi)	Kaninchen	1 zu 300	affinitätsgereinigt	Eigenherstellung
murine ASA (N14)	Kaninchen	1 zu 100/1 zu 1000	SantaCruz	sc-79848
murine ASA (Pineda)	Kaninchen	1 zu 10.0000	Pineda Antikörper-Service	-
LAMP2	Ratte	1 zu 100	DSHB	ABL-93
GFAP	Maus	1 zu 200	ICN	69-1122
$\beta$ III-Tubulin	Maus	1 zu 100	Dianova	T-1315
F4/80	Ratte	1 zu 100	Prof. D. Hartmann	-
MBP	Ratte	1 zu 100	Abcam	ab7349
NG2	Kaninchen	1 zu 100	Millipore	5320
NeuN	Maus	1 zu 100	Chemicon	MAB377

### 3.2.2 Sekundärantikörper

Tabelle 3.3: Verwendete Sekundärantikörper dieser Arbeit.

Antigen	Wirt	Konjugat	Verdünnung	Fabrikant	Bestellnummer
Maus IgG-F(ab') (H+L)	Ziege	Alexa Fluor 488	1 zu 400	Molecular Probes	A-11017
Maus IgG-F(ab') (H+L)	Ziege	Alexa Fluor 546	1 zu 400	Molecular Probes	A-11018
Maus	Ziege	Alkalische Phosphatase	1 zu 250	Jackson	115-055-068
Maus IgG	Ziege	Alexa Fluor 568	1 zu 500	Molecular Probes	A-11031
Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	Alexa Fluor 488	1 zu 500	Molecular Probes	A-11008
Kaninchen IgG (H+L)	Ziege	Cy3	1 zu 500	Dianova	111-165-144
Kaninchen	Ziege	Peroxidase	1 zu 2000/1 zu 20.000	Dianova	111-035-003
Ratte IgG (H+L)	Ziege	DyLight 488	1 zu 800	Dianova	112-485-167
Strep-Tactin	-	Peroxidase	1 zu 3000	iba Life Science	2-1502-001

### 3.3 Zellkulturmedien und -Lösungen

Sofern nicht anders erwähnt, wurden sämtliche Zellkulturmedien mit Nanopur-Wasser hergestellt und anschließend sterilfiltriert. Die Kultivierungsmedien wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit DMEMGlutaMax™ und Penicillin/Streptomycin hergestellt. Die Medien für die Primärzellkultur sind an entsprechender Stelle (siehe 4.3.6) separat aufgeführt.

**Tabelle 3.4:** Verwendete Zelllinien und deren Medien.

Zelllinie	Medium	Bezeichnung	Herkunft
17-/- A1	DMEM 10 % FCS	ASA defiziente Astrozyten	Matzner <i>et al</i> 2000 [75]
BV2	DMEM 1 % FCS	Primäre Mikroglia + <i>v-raf/v-myc</i> Onkogene	Blasi <i>et al</i> 1990 [10]
CHO-S	ExCell + HT	<i>Chinese Hamster Ovary</i> ( <i>-Suspensial</i> )	Zymenex
MEFasa <sup>-/-</sup>	DMEM 10 % FCS	<i>mouse embryonic fibroblasts</i> (ASA-defizient)	Hess <i>et al</i> 1996 [46]
Oli- <i>neu</i>	SATO	Oligodendrozytenvorläufer mit <i>t-neu</i> Onkogen	Jung <i>et al</i> 1995 [52]

#### CHO-S-Kultivierungsmedium

ExCell302 (Sigma)  
 100 U/ml Penicillin  
 100 µg/ml Streptomycin  
 2 mM L-Glutamin  
 1 x HT Supplement (100 Hypoxanthin, 16 µM Thymidin)

#### DAPI Konzentration der Stammlösung 5 mg/ml:

Gebrauchslösung: 5ng/ml

#### Einfriermedium:

90 % Kultivierungsmedium  
 10 % (w/v) DMSO

#### Halbflüssiges Medium

40 % Methylzellulosemedium (MethoCult™, Stemcell)  
 60 % CHO-S-Kultivierungsmedium

1 mg/ml G418

**SATO-Medium (100 ml) (modifiziert nach Bottenstein und Sato, 1979 [13]):**

97 ml DMEMGlutaMAX™

1,3 ml 7,5 % (w/v) NaHCO<sub>3</sub>

1 ml Insulin 1 mg/ml

1 ml Putrescin 10 mM

10 µl Progesteron 2 mM

100 µl TIT (I3-Thyronine)

74 µl von 300 µM Selenium

13 µl L-Thyroxin 4 mM

0,01 g Transferrin

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

10 mM HEPES

Bei 4 °C ist das SATO-Medium sieben Tage haltbar. Zur Lagerung wurden 10 ml Aliquots hergestellt, welche bei -20 °C eingefroren wurden. Nach Auftauen der Aliquots wurden noch 1 % Pferdeserum hinzugegeben

**Serumhaltiges DMEM Medium + GlutaMAX™:**

DMEM + GlutaMAX™

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

10 %/1 % FCS

**Paraformaldehyd (PFA) mit Saccharose:**

8 % (w/v) Paraformaldehyd

30 % (w/v) Saccharose

durch Zugabe von NaOH in 1 x PBS unter Erhitzen lösen

**Poly-L-Lysin (PLL) -Stocklösung 1 mg/ml**

Eingesetzte Konzentration 100 µg/ml (0,01 % (w/v)) in PBS





## 4 Methoden

Nicht gesondert aufgeführte Methoden wurden nach Herstellerangaben oder nach Ausubel *et al.* 1987 [5] und Sambrook *et al.* 1989 [105] durchgeführt. Sämtliche Puffer und Lösungen wurden mit Reinstwasser aus einer NANOpure-Anlage von Barnstead hergestellt. Nicht gesondert aufgeführte Lösungen wurden nach Sambrook *et al.* 1989 [105] angesetzt.

### 4.1 Intrazerebroventrikuläre Enzyzersatztherapie

Proteine, die in das Blut injiziert werden, gelangen aufgrund der BHS nicht in das ZNS. Zur Vermeidung der BHS wurde die rhASA direkt in das ventrikuläre System des Gehirns infundiert. Da die dort gebildete Zerebrospinalflüssigkeit ständig erneuert wird [90] ist eine kontinuierliche Gabe der rhASA notwendig. Dies wird durch die intrazerebroventrikuläre (i.z.v.) EET mit osmotischen Minipumpen gewährleistet.

#### 4.1.1 Behandlung der Mäuse

##### 4.1.1.1 Charakterisierung der verwendeten Mausstämme

Zur Untersuchung der i.z.v. ERT wurden verschiedene MLD-Mausmodelle verwendet (siehe Tab. 4.1). Eine länger andauernde Infusion von rhASA in ASA defizienten Mäusen ruft eine Immunantwort hervor [80]. Diese wurde verhindert, indem zusätzlich immuntolerante Mausstämme generiert wurden, die sowohl in ASA<sup>-/-</sup> als auch in ASA<sup>-/-</sup> PLP-CST-Mausmodellen eine inaktive, humane ASA (hASAc69s) exprimieren. Die korrespondierenden Kontroll-Mäuse sind heterozygot für ASA und die entsprechenden Transgene (PLP-CST und hASAc69s), im weiteren Verlauf, zur Vereinfachung, als Wild-Typ (WT) Mäuse bezeichnet. Die Mäuse haben einen gemischten genetischen Hintergrund aus 129ola und C57BL/6. Die komplette Mauszucht wurde von Dr. Ulrich Matzner geplant und durchgeführt.

**Tabelle 4.1: Für i.z.v. EET verwendete Mauslinien.**

Phänotyp	ASA	PLP-CST	hASAc69s	Kontrolle
ASA <sup>-/-</sup>	-/-	ohne	ohne	ASA +/-
ASA <sup>-/-</sup> tolerant	-/-	ohne	+/-	ASA +/- c69s-hASA +/-
ASA <sup>-/-</sup> PLP-CST	-/-	+/-	ohne	ASA +/- PLP-CST +/-
ASA <sup>-/-</sup> PLP-CST tolerant	-/-	+/-	+/-	ASA +/- PLP-CST +/- c69s-hASA +/-

#### 4.1.1.2 Vorbereitung der osmotischen Minipumpen zur Implantation

##### Formulierungspuffer pH 7,5:

3,67 mM Natriumphosphatpuffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)

27 mM Glycin

150 mM Mannitol

Infundiert wurde rhASA (HT-1111, Lot: 1j510, Shire), aufgereinigt aus Überständen von rhASA überexprimierenden CHO Zellen, in Formulierungspuffer. Die spezifische Aktivität der verwendeten rhASA betrug 56,1 U/mg. Mäuse, bei denen eine Scheinbehandlung durchgeführt wurde, erhielten nur Formulierungspuffer. Mithilfe einer 1 ml Spritze wurden 0,25 ml rhASA Lösung, bzw. für die Scheinbehandlung Formulierungspuffer ohne rhASA, in eine osmotische Minipumpe gefüllt. Über einen Katheter und eine Kanüle wurde die rhASA in den rechten Seitenventrikel infundiert. Über einen Zeitraum von vier Wochen wurde rhASA Lösung mit einer Pumprate von 0,25 µl/h, entsprechend 0,25 µg rhASA/h, infundiert.

#### 4.1.1.3 Implantation der osmotischen Minipumpe

Das für diese Arbeit verwendete Pumpensystem von ALZET 2004 wurde mit Hilfe des *Brain Infusion Kit 3* implantiert (ALZET Osmotic Pumps, Cupertino, USA, 2004). Die Größe der Minipumpen beträgt 30 x 7 mm mit einer Kapazität des Reservoirs von 200 µl. Die osmotischen Minipumpen wurden nach Herstellerangaben implantiert. Dazu wurden die Mäuse durch intraperitoneale Injektion von 5 % Chloralhydrat betäubt. Nach Rasieren und Desinfizieren des Kopfes wurde dieser in einer stereotaktischen Kammer fixiert und die Schädelhaut sagittal 2,5 cm eingeschnitten. Mithilfe einer Kanüle wurde ein 2 mm tiefes Loch in den Schädel gebohrt um in den rechten Seitenventrikel zu gelangen (nach den Koordinaten von Paxinos & Franklin 1 mm posterior von Bregma, 1 mm lateral, 2 mm tief [92]). In diesen wurde dann die Kanüle (siehe Abb. 4.1 3) der Minipumpe platziert. Ein Katheter (2) führte von dort zu der Minipumpe (1), die



**Abbildung 4.1: Subkutan implantierte osmotische Minipumpe.**

Eine osmotische Minipumpe von Alzet (1) wurde unter die Rückenhaut implantiert. Ein Katheter (2) führte zu einer Kanüle (3) die den rechten Ventrikel penetrierte.

subkutan auf dem Rücken implantiert wurde. Auf einen Abstandshalter zwischen dem Schädel und der Kanüle wurde verzichtet, da die Eindringtiefe der Kanüle, aufgrund eines verdickten Schädels der MLD-Mausmodelle, zu gering wäre. Bei vorherigen Versuchen einer i.z.v. EET (durchgeführt von Frank Matthes, [71]) verblieben ca. 70 % der eingesetzten rhASA-Lösung in der Minipumpe. Um dies zu umgehen, wurde die befüllte Minipumpe über Nacht (üN) bei 37 °C in 0,9 % NaCl mit 5 % Glukose gelagert. Einströmendes Wasser durch die äußere Membran und die dadurch bedingte Kompression des Reservoirs entließ die Luft aus dem System. Nach Inkubation wurde die Minipumpe subkutan unter die Rückenhaut implantiert. Die Implantation der Minipumpen wurde unter Anleitung und mit Hilfe von Stijn Stroobants (Labor für Biologische Psychologie, Katholische Universität Leuven, Belgien) durchgeführt.

## 4.2 Charakterisierung der behandelten Mäuse

### 4.2.1 Intrakardiale Perfusion von Mäusen

Die für die Perfusion benötigten Lösungen wurden filtriert (0,22 µm Porengröße) und auf 37 °C erwärmt. Nach Betäubung der Mäuse wurde durch kneifen der Pfoten nach einigen Minuten die Schmerzunempfindlichkeit überprüft. Rücklings wurden die Extremitäten auf einer Styroporplatte mittels Kanülen fixiert. Nach Einschnitten des Bauchfells wurde der Brustkorb links und rechts entlang des Sternums geöffnet und das Herz freigelegt. Mit einer Venofix Flügelkanüle (21 G) wurde in den linken Ventrikel eingestochen, das ausfließende Blut, zur Gewinnung des Serums, entnommen und der rechte Vorhof punktiert. Mit einer Peristaltikpumpe (Flussrate ca. 6 ml/min) wurde so lange PBS mit 1 % Procain eingespült bis die Leber eine hellere Farbe hatte (ca. 50 ml). Bei Bedarf wurde nach ca. 25 ml PBS mit ca. 35 ml Fixans fixiert (6 % Glutaraldehyd in PBS für eine Alzianblau-Färbung bzw. 4 % PFA in PBS für IHC an Gefrierschnitten). Die

für die Alzianblau-Färbung verwendeten Mäuse wurden zur besseren Fixierung des Gehirns mit 6 % Glutaraldehyd in PBS nachfixiert. Dazu wurde die Rückenhaut der Mäuse abgezogen, die Schädeldecke entfernt und die Nackenmuskulatur eingeschnitten. Mit dem Kopf voran wurde die Maus dann in einem 50 ml Spitzenröhrchen randvoll gefüllt mit 6 % Glutaraldehyd in PBS bei 4 °C gelagert. Für die anschließende biochemische Analytik (siehe Kap. 4.2.3) wurden die Mäuse nur mit PBS perfundiert.

## **4.2.2 Histologische Analytik**

### **4.2.2.1 Vibratomschnitte von Glutaraldehyd fixierten Mäusen**

Für die Visualisierung des Speichermaterials von MLD-Mausmodellen wurde eine Alzianblau-Färbung durchgeführt (siehe Kap. 4.2.2.2). Für diese wurden 100  $\mu\text{m}$  dicke Vibratomschnitte benötigt. Die Schnitte wurden an einem Leica VT 1200S angefertigt. Dazu wurden die verschiedenen Regionen des ZNS mit einer dünnen Schicht UHU Sekundenkleber auf dem Probenhalter befestigt. Nach Entnahme des Gehirns, mit dem oberen Teil des zervikalen Rückenmarks, wurde dieses auf die dorsale Seite gelegt. Mit einem Skalpell wurde rostral vom Chiasma opticum (Interaural +3,5 Paxions & Franklin [92]) und kaudal vom Hypothalamus (Interaural +1,1 Paxions & Franklin [92]) geschnitten. Als Klebefläche diente die Schnittstelle des Hypothalamus. Das Zerebellum wurde vorsichtig abgelöst und die darunterliegende Pons freigelegt. Getrennt wurde die Pons von dem Rückenmark durch einen horizontalen Schnitt am Obex (Interaural -4,12 Paxions & Franklin [92]), welcher als Klebefläche diente. Auch das zerebrale Rückenmark wurde an dieser Schnittkante am Probenhalter befestigt. Es musste darauf geachtet werden nur eine dünne Schicht Sekundenkleber zu verwenden, da das mit Sekundenkleber getränkte Gewebe nicht mehr für die Auswertung genutzt werden kann.

Mit einer Amplitude von eins und einer Geschwindigkeit von 22 mm/s wurden 100  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte in PBS angefertigt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Schnitte bei 4 °C in 3 % Glutaraldehyd gelagert.

### **4.2.2.2 Alzianblau-Färbung**

#### **MgCl<sub>2</sub>-Lösung 2,5 M:**

50,75 g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O (trocken gelagert) in 100 ml H<sub>2</sub>O

#### **Natrium-Acetat-Puffer 0,1 M; pH 5,7:**

0,1 M Natrium-Acetat

Einstellen des pH-Wertes mit Essigsäure

**Scott-Fixativ:**

2,5 % Glutaraldehyd  
300 mM MgCl<sub>2</sub>-Lösung  
25 mM Na-Acetat Puffer pH 5,7  
Auf 300 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen

**Färbelösung:**

0,025 % Alcec Blue in Scott-Fixativ  
Lösen der Aggregate mittels Ultraschallbehandlung  
Lösung vor dem Benutzen filtrieren

Das kationische Färbemittel Alzianblau färbt stark anionische Substanzen, z.B. sulfatierte Glykosaminoglykane, durch Bindung an deprotonierte Carboxylgruppen. Bei einem pH von 5,7 sind alle anderen möglichen Bindungspartner nicht mehr negativ geladen, was eine selektives Anfärben der sulfatierten Proteoglykane, wie die Sulfatidakkumulationen, zur Folge hat [128]. Zusätzlich wird die Selektivität der Färbung durch die Anwesenheit von Mg<sup>2+</sup>-Ionen verstärkt, welche an freie, negative Ladungen binden und diese absättigen [110]. Der pH-Wert und die Mg-Konzentration sollten von Zugabe des Färbereagens bis zum Ende der Inkubation vorhanden sein, da einmal an negative Ladungen gebundenes Alzianblau nicht mehr abgelöst werden kann.

Die in 3 % Glutaraldehyd gelagerten Vibratomschnitte wurden zunächst dreimal mit Scott-Fixativ gewaschen und anschließend üN bei 4 °C in Scott-Fixativ inkubiert. Nach Entfernung des Scott-Fixativs wurde die Färbelösung hinzugegeben und drei Stunden auf ZNS- bzw. eine Stunde auf Nierenschnitten inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal mit Scott Fixativ gewaschen und die Schnitte üN in Scott Fixativ bei 4 °C gelagert. Eingedeckelt wurden die Schnitte in Aqua Tex (Merk Millipore, 1085620050). Dokumentiert wurden die Färbungen durch mikroskopische Aufnahmen mit einem Axiophot von Zeiss bei identischen Belichtungszeiten.

**4.2.2.3 Immunhistochemische Färbung von PFA-fixierten Gefrierschnitten**

Für IHC an PFA-fixiertem Gewebe (siehe Kap. 4.2.1) wurden 10 µm dicke Gefrierschnitte mit einem Leica CM 3050 angefertigt. Dazu wurden diese 15 Minuten an der Luft getrocknet und anschließend mit PBS benetzt. Nach Permeabilisierung mit 0,1 % Triton X-100 in PBS wurde dreimal je 15 Minuten mit PBS gewaschen. Zur Reduktion der Autofluoreszenz durch Blockade freier Aldehydgruppen wurden die Schnitte zehn Minuten in frisch angesetztem 0,5 % NaBH<sub>4</sub> inkubiert. Mit 2 % *Normal Goat Serum* in PBS wurden die Schnitte für 30 Minuten bei RT blockiert. Die Inkubation des Primärantikörpers wurde üN bei 4 °C in 2 % BSA in PBS durchgeführt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 15 Minuten erfolgte die Sekundärantikörper-Inkubation für drei Stunden zusammen mit DAPI zur Kernfärbung bei RT in 2 % BSA in PBS.

Die Schnitte wurden nochmals dreimal mit PBS für 15 Minuten gewaschen, dann kurz mit destilliertem Wasser gespült und in Kaiser Gelatine eingedeckelt. Der zur rhASA Detektion verwendete affinitätsgereinigte anti-hASA Antikörper bindet auch an die inaktive hASAc69s immuntoleranter Mäuse. Um dies zu vermeiden wurden, für immunhistochemische Färbungen von infundierter rhASA, Mäuse ohne die inaktive hASAc69s verwendet, die eine Woche mittels i.z.v EET behandelt wurden.

## 4.2.3 Biochemische Analytik

### 4.2.3.1 Herstellen von Gewebhomogenaten

#### **Homogenisierungspuffer:**

TBS pH 7,4

0,5 % Triton N-101

#### **Protease-Inhibitoren (Endkonzentrationen):**

2  $\mu\text{g/ml}$  Aprotinin

1 mM EDTA pH 8,0

5 mM Iodacetamid

0,5  $\mu\text{g/ml}$  Leupeptin

0,4 mM Pefabloc SC

0,7 mg/ml Pepstatin A

In 1,5 ml eiskaltem TBS wurden ca. 150-300 mg mit PBS perfundiertes Gewebe (siehe Kap. 4.2.1) in einem Pyrex-Röhrchen mittels Ultraturrax bei 24.000 rpm homogenisiert. Nicht verwendetes Rohhomogenat wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Für Protein- und ASA- Analysen wurde das Rohhomogenat eins zu vier in Homogenisierungspuffer mit Protease-Inhibitoren verdünnt (333  $\mu\text{l}$  Rohhomogenat + 999  $\mu\text{l}$  Homogenisierungspuffer). Nach Einfrieren und Ultrabeschallung wurde das verdünnte Homogenat bei 16.000 x g zentrifugiert und nur der Überstand verwendet. Nicht benötigter Überstand wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Gewinnung der mikrosomalen Fraktion für die Lipidanalytik wurden 600  $\mu\text{l}$  Rohhomogenat bei 100.000 x g für 60 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Gewebe mit einer geringeren Masse von ca. 30-100 mg wurde ebenfalls in 1,5 ml eiskaltem TBS homogenisiert. Für weitere ASA- und Protein-Analysen wurden 500  $\mu\text{l}$  dieses Rohhomogenates mit 500  $\mu\text{l}$  Homogenisierungspuffer mit Protease-Inhibitoren verdünnt. Für die Lipidanalytik wurden 1000  $\mu\text{l}$  Rohhomogenat verwendet. Weitere Vorgehensweisen wurden wie oben beschrieben durchgeführt.

#### 4.2.3.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde das Bio-Rad RC DC Kit verwendet (Bio-Rad, 500-0120).

#### 4.2.3.3 ELISA

Zur selektiven Quantifizierung humaner ASA dient der indirekte Sandwich-ELISA mit einer Nachweisgrenze von unter 50 pg ASA in einem linearen Bereich bis ca. 1,5 ng ASA [74].

**Beschichtungspuffer:**

25 mM Tris/HCl pH 7,0

**Waschpuffer:**

0,1 % (w/v) Triton X-100 in PBS

**Blockierungslösung:**

5 % (w/v) Milchpulver

0,02 % (w/v) Triton X-100

**Substratlösung:**

1 mg/ml ABTS (Roche, 10102946001)

in ABTS-Substratpuffer (Roche, 1112597)

Für die Durchführung des ELISA wurden Zellkulturplatten (Sarstedt, 83.1835) verwendet. Zur Vereinfachung sind die einzelnen Schritte tabellarisch aufgeführt.

Zur Inkubation der Standards bzw. der Proben wurden 100  $\mu$ l Blotto vorgelegt und in jede Kavität die Standards oder die Probe in entsprechendem Verdünnungspuffer einpipetiert. Die Absorption des umgesetzten Substrates wurde bei 405 nm in einem Mikroplattenleser von Tecan mit einer Referenzwellenlänge von 505 nm photometrisch gemessen. Anhand der Standards, mit bekannten ASA-Konzentrationen, wurde eine Kalibriergerade erstellt und die ASA-Menge in den Proben berechnet.

#### 4.2.3.4 Vorbehandlung von Pansorbin

**Pansorbin A Suspension:**

Calbiochem, Novabiochem, 507861

**Tabelle 4.2: Protokoll zur Durchführung eines ELISA.**z- $\alpha$ -ka-POX = Peroxidase-gekoppelter Detektionsantikörper Ziege-anti-Kaninchen

Schritt	Lösung	Inkubation
Beschichtung	0,125 $\mu$ g 19-16-3 in 200 $\mu$ l Beschichtungspuffer	ün 4 °C
Waschen	300 $\mu$ l Beschichtungspuffer	RT
Blockierung	200 $\mu$ l Blockierungspuffer	$\geq$ 20 Minuten RT
Zweimal Waschen	300 $\mu$ l Waschpuffer	RT
Homogenat Bindung	200 $\mu$ l in Blockierungspuffer/Homogenisierungspuffer	37 °C 1,5 Stunden
Zweimal Waschen	300 $\mu$ l Waschpuffer	RT
Primärantikörper BE#3	1 zu 2000 50 $\mu$ l in Blockierungspuffer	37 °C eine Stunde
Zweimal Waschen	300 $\mu$ l Waschpuffer	RT
Sekundärantikörper z- $\alpha$ -ka-POX	1 zu 2000 50 $\mu$ l in Blockierungspuffer	37 °C eine Stunde
Dreimal Waschen	300 $\mu$ l Waschpuffer	RT
Visualisierung	50 $\mu$ l Substratlösung	RT

**Net-Puffer:**

50 mM Tris/HCl, pH 7,4

150 mM NaCl

5 mM EDTA

**Tabelle 4.3: Protokoll zum Waschen von Pansorbin.**

Schritt	Lösung	Inkubation
Zentrifugation bei 16.000 x g	Pansorbin A Suspension	fünf Minuten
Resuspendieren	1 ml Net-Puffer	RT
Zentrifugation bei 16.000 x g	-	fünf Minuten
Resuspendieren	1 ml Net-Puffer + 1 % SDS	fünf Minuten bei 95 °C
Zentrifugation bei 16.000 x g	-	fünf Minuten
Dreimal Resuspendieren	1 ml Net-Puffer + 5 mg/ml + 0,5 % Triton X-100	RT
Zentrifugation bei 16.000 x g	-	fünf Minuten
Zweimal Resuspendieren	1 ml PBS	RT
Zentrifugation bei 16.000 x g	-	fünf Minuten
Resuspendieren	10faches Vol. PBS + 10 % BSA + 0,04 % Natriumazid	RT



#### 4.2.3.5 Immunpräzipitation

Zur Bestimmung der Menge an infundierter rhASA in immuntoleranten ASA<sup>-/-</sup> und ASA<sup>-/-</sup> PLP-CST-Mäusen musste diese von der endogenen mASA (in Falle der WT-Kontrolle) und der inaktiven hASAc69s separiert werden. Dazu wurde zunächst sowohl die infundierte rhASA als auch die inaktive hASAc69s immunpräzipitiert. Anschließend wurde die Menge an infundierter rhASA ermittelt indem ein ASA-Aktivitätstest (siehe Kap. 4.2.3.6) durchgeführt wurde, die inaktive hASAc69s lieferte dabei keine Umsetzung des artifiziellen Substrates. Zur selektiven Bestimmung des Gesamtgehalt von hASA in Gewebehomogenaten wurde mittels ELISA (siehe Kap. 4.2.3.3) der ASA-Gehalt bestimmt. Für die Immunpräzipitation wurde der zehnfache molare Überschuss an Antikörper (19-16-3) eingesetzt. Als Kontrollen dienten TBS/1 % BSA (Negativkontrolle) und TBS/1 % BSA, versetzt mit definierter rhASA-Menge mit (Positivkontrolle) und ohne Antikörper (Negativkontrolle).

**Tabelle 4.4: Protokoll zum Präzipitieren von ASA.**

Schritt	Lösung	Inkubation
Verdünntes Homogenat Präzipitieren	19-16-3 in 100 $\mu$ l TBS/BSA 20 $\mu$ l Pansorbin (TBS/BSA gewaschen)	eine Stunde RT zwei Stunden RT
Zentrifugation bei 16.000 x g Abnahme Überstand	- Verwahren für Aktivitätsbe- stimmung bzw. Nachpräzipi- tation	30 Sekunden RT 4 °C
Zweimal Waschen	200 $\mu$ l TBS/BSA	4 °C
Zentrifugation bei 16.000 x g	-	30 Sekunden RT
Zweimal Resuspendieren	1 ml PBS	RT
Zentrifugation bei 16.000 x g	-	fünf Minuten
Resuspendieren	200 $\mu$ l TBS/BSA	4 °C

Zur Nachpräzipitation wurde 1  $\mu$ g 19-16-3 Antikörper und 5  $\mu$ l Pansorbin eingesetzt.

#### 4.2.3.6 ASA- und $\beta$ -Hexosaminidase ( $\beta$ -Hex)-Aktivitätstest

##### ASA-Substrat:

- 10 mM *p*-NCS
- (4-Nitro catecholsulfat, Sigma, N7251)
- 10 % NaCl
- 0,3 % Triton X-100
- 1 mg/ml BSA (zur Stabilisierung der ASA)
- in 0,5 Na-Acetat pH 5

**ASA-Stopplösung:**

1 M NaOH

**β-Hex-Substrat:**10 mM *p*-NPAG

(4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-Glukosaminid, Sigma, N9376)

0,2 % BSA

0,3 % Triton X-100

0,1 M Natriumcitrat pH 4,6

in 0,5 Na-Acetat pH 5

**β-Hex-Stopplösung:**

0,4 M Glycin, pH 10,4 (mit 10 M NaOH eingestellt)

Zur Bestimmung der Aktivität von ASA bzw. β-Hex wurde diese mit dem artifiziellen Substrat *para*-Nitro catechol-Sulfat bzw. *para*-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-Glukosaminid inkubiert. Üblicherweise wurde die verdünnte oder unverdünnte Probe in TBS/BSA mit 200 μl Substrat für 30 min bei 37 °C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1 M NaOH bzw. 0,4 M Glycin verwendet. Das Proben- und das NaOH-Volumen als auch die Inkubationszeit können je nach Versuch variieren. Die Absorption wurde bei 515 bzw. 405 nm in 1 cm-Küvetten (Extinktionskoeffizienten:  $\epsilon = 12.400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  bzw.  $18.500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) gemessen. Die Aktivität der Probe errechnete sich wie folgt (siehe Formel) wobei die Faktoren 12,4 bzw. 18,5 den molaren Extinktionskoeffizienten durch 1000 entsprechen

$$ASA = \frac{mU}{ml} = \frac{Gesamtvolumen[ml] * 1000}{12,4 * Inkubationszeit[min] * Probenvolumen[ml]} * OD_{515}$$

$$\beta - Hex = \frac{mU}{ml} = \frac{Gesamtvolumen[ml] * 1000}{18,5 * Inkubationszeit[min] * Probenvolumen[ml]} * OD_{405}$$

Die spezifische Aktivität (mU/μg) von ASA wird durch das Beziehen der Aktivität in mU/ml auf die ASA<sup>-/-</sup>-Konzentration in mg/ml errechnet.

**4.2.3.7 Bestimmung des ASA-Antikörper Titers von Serum**

Zur Bestimmung des ASA-Antikörper Titers wurde Serum mit ASA inkubiert. Die ASA-Antikörper-Komplexe wurden mittels Pansorbin gefällt und dem Überstand entzogen. Die im

Überstand verbliebene ASA wurde mittels Aktivitätstest gemessen und somit konnte der Titer bestimmt werden.

Für den Versuch wurden 30 mU/ml ASA pro Bedingung eingesetzt. Von dem Serum wurden 4  $\mu$ l in 96  $\mu$ l TBS/0,2 % BSA pipettiert. Davon wurde eine serielle eins zu eins Verdünnungsreihe (1-10) hergestellt (50  $\mu$ l Serum Verdünnung mit 50  $\mu$ l TBS/0,2 % BSA). Den einzelnen Verdünnungsschritten wurden jeweils 50  $\mu$ l 30 mU/ml ASA zugefügt. Als Kontrollen wurden 50  $\mu$ l TBS/0,2 % BSA als Leerwert und 50  $\mu$ l TBS/0,2 % BSA mit 30 mU/ml ASA ohne 19-16-3 zur Bestimmung der eingesetzten ASA-Aktivität mitgeführt. Nach einer Stunde über Kopf Inkubation wurden 20  $\mu$ l Pansorbin zu den ersten beiden Verdünnungen, 10  $\mu$ l zu Verdünnung drei und vier und 5  $\mu$ l zu den weiteren Verdünnungen gegeben und wieder eine Stunde über Kopf inkubiert. Nach Zentrifugation bei 16.000 x g für 30 Sekunden wurde von 50  $\mu$ l des Überstandes die ASA-Aktivität bestimmt (siehe Kap. 4.2.3.6). Dazu wurden 200  $\mu$ l ASA-Substratlösung verwendet, 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und mit 500  $\mu$ l 1 M NaOH abgestoppt. Für die Durchführung des Aktivitätstests im 96-Kavitäten Format wurden 25  $\mu$ l Überstand, 100  $\mu$ l ASA-Substrat und 150  $\mu$ l 1 M NaOH verwendet. Gemessen wurde bei OD<sub>505</sub> im Mikroplattenleser von Tecan.

#### 4.2.3.8 Lipidextraktion von Gangliosiden und Sulfatiden

Vor Beginn der Extraktion wurden RP-18 Säulchen (Merck, 1.13900) gewaschen. Dazu wurde das RP-18 Material in zweifachem Volumen (v/v) Chloroform/Methanol zwei zu eins aufgenommen und 30 Minuten gerührt. Nach Absinken des Materials für 20 Minuten auf Eis wurde viermal mit je zwei Volumen (v/v) Methanol gewaschen (zwischen jedem Waschschrift 20 Minuten auf Eis Absinken lassen). Die Lagerung erfolgt bei 4 °C in Methanol. Zu der nach Kapitel 4.2.3.1 gewonnenen mikrosomale Fraktion wurden 5 ml (ab 30-300 mg Gewebe) oder 2 ml (für 20-100 mg Gewebe) Chloroform/Methanol zwei zu eins in das Pyrex-Röhrchen gegeben. Nach Zerkleinerung des Pellets mittels Ultraturrax wurden unpolare Lipide unter ständigem Rühren für vier Stunden bei 60 °C herausgelöst. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation für zehn Minuten bei 800 x g bei 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und über eine mit Glaswolle gestopfte Pasteurpipette in ein neues Pyrex-Röhrchen filtriert und bei -20 °C gelagert. Polare Lipide wurden nun durch erneute Extraktion des Pellets mit 5 ml (2 ml) Chloroform/Methanol eins zu eins für vier Stunden bei 60 °C isoliert. Nach einer weiteren Zentrifugation (wie oben) wurde der Überstand durch die mit Glaswolle gestopfte Pasteurpipette gegeben und mit dem Überstand aus der ersten Extraktion vereint. Die vereinten gefilterten Überstände wurden üN bei -20 °C gelagert und am nächsten Tag bei 50 °C im N<sub>2</sub>-Strom vollständig eingedampft und in 5 ml (2,5 ml) Methanol gelöst. Esterbindungen von Triglyceriden und Phosphoglyceriden wurden durch Zugabe von 125  $\mu$ l (62,5  $\mu$ l) 4 N NaOH und zweistündiger Inkubation unter Rühren bei 37 °C zerstört. Die alkalische Hydrolyse wurde durch Zugabe von 20  $\mu$ l (10  $\mu$ l) Eisessig gestoppt. Bei dieser Reaktion entsteht Wasser, welches durch Eindampfen unter N<sub>2</sub>-Strom bei 50 °C entfernt wurde. Das bei dieser Reaktion zusätzlich entstandene Natriumazetat wurde über RP-18 Säulen entfernt. Zur Herstellung dieser Säulen

wurde eine Pasteurpipette mit in Methanol gelagerter Glaswolle gestopft, mit gewaschenem RP-18 Material befüllt (etwa 3 cm) und zweimal mit 1 ml Chloroform/Methanol/0,1 M KCl 6:96:94 äquilibriert. Die eingedampfte Lipidfraktion wurde anschließend in 1 ml Methanol aufgenommen, und für fünf Minuten mit Ultraschall behandelt. Nach Versetzen der Lipidlösung mit 1 ml 300 mM  $\text{NH}_3\text{Ac}$  wurde diese über die RP-18 Säulen gegeben. Das Pyrex-Röhrchen wurde zweimal mit 0,5 ml Methanol/200 mM  $\text{NH}_3\text{Ac}$  eins zu eins gewaschen und damit die Säule beladen. Anschließend wurden die Säulen sechsmal mit 1 ml HPLC-Wasser gewaschen. Eluiert wurden die Lipide mit 1 ml Methanol und anschließend sechsmal mit Chloroform/Methanol eins zu eins. Nach vollständigem Eindampfen des Eluates unter  $\text{N}_2$ -Strom bei 50 °C wurde dieses in 600  $\mu\text{l}$  (250  $\mu\text{l}$ ) Chloroform/Methanol aufgenommen.

#### 4.2.3.9 Dünnschichtchromatographie und Auswertung

##### Kupfersulfat/Phosphorsäure-Sprühreagenz:

15,6 g  $\text{CuSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

9,4 ml  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85% (w/v)

auf 100 ml mit  $\text{H}_2\text{O}$  auffüllen

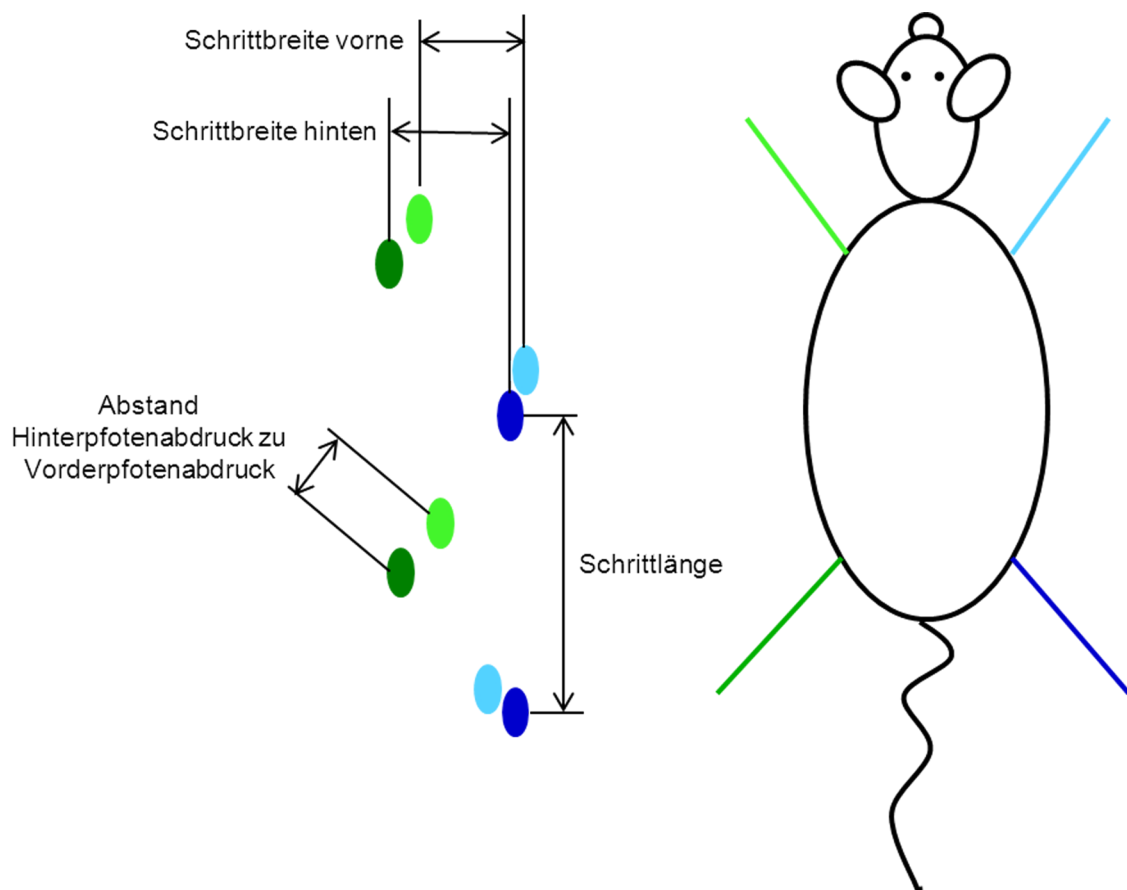
Lipidextrakte und entsprechende Lipidstandards wurden mit Hilfe des ATS4 auf eine für zehn Minuten bei 150 °C vorgebackene 20 x 20 cm Kieselgel 60 Dünnschichtplatte (Merck, 1.05721.0001) aufgesprüht. Zur Auftrennung wurde die Platte in eine mit dem Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser (70/30/4) gesättigte Kammer senkrecht hineingestellt. Visualisiert wurden die Lipide auf der Kieselgelplatte durch Veraschung. Dazu wurde die Platte mit dem Kupfersulfat/Phosphorsäure-Sprühreagenz eingesprüht, kurz mit dem Fön getrocknet und für fünf Minuten bei 150 °C inkubiert. Nach dem Einscannen der Platte wurden die Lipidbanden mit der Software AIDA densitometrisch quantifiziert. Für die weitere Auswertung wurde auf Cholesterol normiert.

#### 4.2.4 Verhaltensanalyse

Eine Woche postoperativ starteten die Verhaltensanalysen an den immuntoleranten,  $\text{ASA}^{-/-}$ - und  $\text{ASA}^{-/-}$  PLP-CST-Mäusen. Diese wurden ausschließlich von Stijn Stroobants (Labor für Biologische Psychologie, Katholische Universität Leuven, Belgien) durchgeführt. Die Mäuse wurden auf ein transparentes, motorbetriebenes Laufband gesetzt welches von einem Plexiglas-kubus umschlossen war (39,5 cm x 7,2 cm x 5,5 cm) Nach einer Eingewöhnungsphase von 30 Sekunden wurden die Mäuse 60 Sekunden bei einer Geschwindigkeit von 22 cm/s getestet. Damit die Mäuse das Tempo hielten, wurden sie durch ein elektrisches Gitter (0,8 mA), welches am Ende des Laufbands befestigt war, stimuliert. Eine USB Kamera (Auflösung 640 x 48 Pixel; 30 Hz) war 12 cm vom Laufband entfernt, seitlich befestigt und zeichnete ein ventrales, gespiegeltes Bild auf. Somit konnte die Position der Pfoten beobachtet werden. Für die Analysen wurden

nur Schrittsequenzen ausgewählt die einem regelmäßig abwechselnden Muster von links-vorne rechts-hinten rechts-vorne links-hinten folgten. Für die Auswertung der Bilder wurde ein Algorithmus verwendet, welcher mit Matlab entwickelt wurde [65]. Verschiedene Schrittparameter konnten aus dem Videomaterial gewonnen werden. Die ermittelten Schrittparameter sind in Abbildung 4.2 farblich dargestellt.

- die Schrittbreite vorne und hinten (kontralaterale Fußabdrücke)
- der Abstand des Vorderpfoten Abdrucks und folgendem Hinterpfoten Abdrucks
- die Schrittlänge rechts und links (folgende Abdrücke der gleichen Pfote)



**Abbildung 4.2: Ermittelte Schrittparameter der Maus.**

A: Schrittparameter B: Schematisch dargestellte Maus mit farblich markierten rechten und linken Vorder- und Hinterläufen.

## 4.3 Arbeiten mit adhärenenten Zellen

Alle Lösungen und Materialien wurden steril verwendet. Wenn nicht anders erwähnt wurden die Lösungen vor Gebrauch auf 37 °C erwärmt. Sämtliche Zelllinien und Primärzellen wurden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Die für die Zellkultur verwendeten Lösungen und Medien sind in Kapitel 3.3 beschrieben.

### 4.3.1 Beschichtung von Zellkulturgefäßen

Zellen, die zum Adhärenieren eine Beschichtung der Platte bzw. Deckgläschen benötigten, wurden vorab mit Poly-L-Lysin (PLL) oder Poly-D-Ornithin (PDO) beschichtet. Die eingesetzte Konzentration betrug 100 µg/ml. Der Boden des Zellkulturgefäßes wurde zunächst mit PLL oder PDO bedeckt. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation bei 37 °C. Da PLL/PDO für Zellen toxisch ist, wurden die Gefäße anschließend dreimal mit PBS gespült. Die Zellen wurden auf den noch feuchten Boden ausgesät.

### 4.3.2 Einfrieren von Zellen

Zunächst wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, die Reaktion mit FCS haltigem Medium gestoppt und die Zellen durch Zentrifugation bei 200 x g für drei Minuten bei RT pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 1 ml Einfriermedium (siehe Kap. 3.3) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen mit Schraubverschluss überführt. Das Kryoröhrchen wurde in einen Styroporbehälter gestellt und bei -80 °C eingefroren. Zur weiteren Lagerung wurden die Kryoröhrchen in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert.

### 4.3.3 Auftauen von Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden zunächst im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, in 20 ml vorgewärmtem Kultivierungsmedium aufgenommen und bei 200 x g für drei Minuten bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem Medium resuspendiert und auf einem sterilen Zellkulturgefäß ausplattiert. Da das im Einfriermedium enthaltene DMSO für die Zellen toxisch ist, wurde zügig gearbeitet und die Zellen so schnell wie möglich in das Kulturmedium überführt.

### 4.3.4 Passagieren von adhärenenten Zelllinien

Die Zellen wurden, wie in Kapitel 4.3.2 erwähnt, mit Trypsin und mittels Zentrifugation gewonnen. Anschließend wurde das Pellet im entsprechenden Medium (siehe Tab. 3.4) resuspendiert. Wenn nicht gesondert erwähnt, wurden  $2 \times 10^6$  Zellen auf eine neue 10 cm Kulturschale ausgeteilt. Für Endozytoseexperimente wurden  $1,2 \times 10^5$  Zellen in eine Vertiefung einer zwölf-Kavitäten-Platte und  $3 \times 10^5$  Zellen in eine Vertiefung einer sechs-Kavitäten-Platte gegeben. Für

Immunzytochemie (IZC) wurden  $5 \times 10^4$  Zellen auf Deckgläschen in eine Vertiefung einer 24-Kavitäten-Platte ausplattiert.

### 4.3.5 Bestimmung der Zellzahl

Zur Ermittlung der Zellzahl wurde von einer Zellsuspension 10 µl in eine Neubauer Zählkammer pipettiert. Es wurden vier Großquadrate, die aus jeweils 16 Kleinquadraten bestehen, unter dem Lichtmikroskop ausgezählt, der Mittelwert errechnet und dieser mit dem Faktor  $10^4$  multipliziert. Der ermittelte Wert entspricht der Zellzahl/ml.

### 4.3.6 Isolation von primären Zellen

#### 4.3.6.1 Isolation von primären, neuronalen Mischkulturen

##### Kultivierungsmedium:

DMEMGlutaMAX™  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin  
10 % FCS

Aus Gehirnen von ein bis zwei Tage alten Mäusen können neuronale Mischkulturen gewonnen werden. Die Präparation erfolgte auf Eis mit eiskalten Lösungen. Nach Gehirnentnahme wurde das Zerebellum entfernt. Durch Rollen des Vorderhirns über ein autoklaviertes Whatman-Papier konnten die Meningen entfernt werden. Das meningenfreie Vorderhirn wurde, bis zur Präparation aller Gehirne eines Wurfes, in 10 ml eiskaltem PBS mit 5 % FCS auf Eis gelegt. Anschließend wurden die Gehirne zunächst mit einer 1 ml Pipettenspitze, dann mit ausgezogenen Pasteurpipetten mit kleiner werdenden Durchmessern trituiert. Die Suspension wurde durch ein 40 µm Zellsieb gegeben und anschließend mit Puffer verdünnt. Bei 200 x g RT wurden die Zellen zehn Minuten zentrifugiert und der Überstand entfernt. Das Pellet wurde in Kultivierungsmedium resuspendiert. Drei Gehirne wurden pro T75-Flasche bzw. Kavitäten-Platte ausgeteilt. Um den Verlust von Neuronen für eine immunzytochemische Färbung der neuronalen Mischkultur zu vermeiden, wurde die Zellsuspension direkt in einer 24-Kavitäten-Platte auf Deckgläschen ausgesät. Nach vier bis fünf Tagen wurde das Medium gewechselt. Solange die Zellen noch nicht konfluent waren, wurde nach weiteren vier bis fünf Tagen erneut das Medium gewechselt. Nach Erreichen der Konfluenz wurde die neuronale Mischkultur entweder passagiert, z.B. für die Gewinnung von Astrozyten (siehe Kap. 4.3.6.3) oder die Deckgläschen für die IZC fixiert.

#### 4.3.6.2 Isolation von primären Mikroglia

##### Kultivierungsmedium:

DMEMGlutaMAX™

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

10 % FCS

(5 ng/ml GM-CSF (Peprotech, 315-03))

Primäre Mikroglia wurden aus den Gehirnen von zwei Tage alten Mäusen gewonnen. Die Präparation erfolgte wie in Kapitel 4.3.6.1 beschrieben. Nach vier bis fünf Tagen wurde das Medium zu GM-CSF-haltigem Medium gewechselt. Im weiteren Verlauf wurde nur noch mit GM-CSF-haltigem Medium gearbeitet. Zu diesem Zeitpunkt lagen erst sehr wenige adhärente Zellen vor. Dieser Umstand hatte allerdings keine Auswirkungen auf die später folgende Ernte der Mikroglia. Das Medium wurde zweimal alle vier bis fünf Tage gewechselt. Nach etwa zehn Tagen konnten die Mikroglia geerntet werden. Diese waren, aufgrund ihrer Eigenschaft das Licht zu brechen, gut von der darunterliegenden Schicht aus Astrozyten und Fibroblasten zu unterscheiden. Durch sehr kräftiges, seitliches Schlagen gegen die Kulturflasche lösten sich die Mikroglia ab. Die schwimmenden Mikroglia wurden aufgenommen und für die weiteren Experimente entsprechend ausgesät. Nicht adhärente Zellen wurden durch Mediumwechsel nach zwei Stunden entfernt. Zu der Mischkultur wurde entweder frisches Medium gegeben, oder die Kultur wurde eins zu eins gesplittet. Nach weiteren vier bis fünf Tagen konnten erneut Mikroglia abgeschlagen werden. Beim ersten Abschlag waren etwa drei Millionen Mikroglia zu erwarten. Nach jedem weiteren Abschlag wurden weniger Zellen gewonnen, sodass nach dem vierten Mal nur noch etwa  $5 \times 10^5$  Zellen geerntet werden konnten.

#### 4.3.6.3 Isolation von primären Astrozyten

Zur Isolation von Astrozyten wurde die passagierte, neuronale Mischkultur (siehe Kap.4.3.6.1) verwendet. Neurone überleben die Passage nicht. Oligodendrozyten waren, wenn überhaupt, nur in sehr geringer Anzahl vorhanden. Mikroglia wurden durch Abschlagen (siehe Kap. 4.3.6.2) entfernt.

#### 4.3.6.4 Isolation von primären Oligodendrozyten-Vorläuferzellen

Multipotente neurale Vorläuferzellen können OVZ bilden, was die Generation von OVZ aus neuralen Vorläuferzellen ermöglicht [68]. Die Generierung von OVZ wird durch die Ausbildung von Oligosphären aus Neurosphären erreicht. In dieser Arbeit wurden die OVZ nach der Methode von Chen *et al.* 2007 [23] aus P0 Mäusen isoliert.



**Neurosphär Medium (NM)**

DMEM/F12  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin  
2 mM L-Glutamin  
100 µg/ml Apo-Transferrin (Gibco, 1108016)  
25 µg/ml Insulin (Sigma, I9278)  
20 nM Progesteron (Sigma, P0130)  
60 µM Putrescin (Sigma, P7505)  
30 nM Natriumselenit (Sigma, S5261)  
20 ng/ml bFGF (Peprotech, 100-18B)  
20 ng/ml EGF (Peprotech, 100-15)

**Oligosphär Medium (OM)**

70 % Neurosphär Medium (NM ohne Wachstumsfaktoren FGF und EGF)  
30 % B104 konditioniertes Neuroblastom Medium (B104 KM)

**B104 konditioniertes Neuroblastom Medium**

B104 Neuroblastom Medium  
DMEM/F12  
100 U/ml Penicillin  
100 µg/ml Streptomycin  
2 mM L-Glutamin  
10 % FCS

B104 Zellen nach Erreichen von 90 Konfluenz mit 1x Pucks BSS waschen

**10x Pucks BSS:**

NaCl 80 g  
KCl 4 g  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,9 g  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 g  
Glukose 10 g  
ad 1L H<sub>2</sub>O dd und Sterilfiltrieren

Die Zellen wurden mit B104 Neuroblastom Medium und Zugabe von 1 x N2 (Invitrogen, 17502048) gefüttert. Nach vier Tagen wurde das Medium abgenommen. Anschließend wurde 1 µg/ml Phenylmethylsulfonylfluorid (Sigma S7626) hinzugegeben und dies bei 2000 x g für 30 Minuten im Ausschwingrotor bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde über einen

Sterilfilter mit einer Porengröße von  $0,22\ \mu\text{m}$  filtriert und konnte anschließend bei  $-80\ ^\circ\text{C}$  (für sechs Monate) gelagert werden

**Ausplattiermedium:**

DMEMGlutaMAX™

100 U/ml Penicillin

100  $\mu\text{g/ml}$  Streptomycin

20  $\mu\text{M}$  Forskolin (Sigma, F6886)

5 ng/ml PDGF-AA (Preprotech, 315-17)

20 ng/ml bFGF (Peprotech, 100-18B)

Zur Herstellung von Neurosphären wurden Gehirne von P0 alten Mäusen entnommen und in eine Petrischale mit sterilem, eiskaltem HBSS überführt. Nach Präparation von drei Mäusen wurden die Meningen mithilfe von autoklaviertem Whatman Papier entfernt. Die olfaktorischen Bulbi und das Zerebellum wurden entfernt und die Gehirnbrocken in eiskaltes NM gegeben (pro Hirn 0,5 ml). Um eine homogene Suspension zu erhalten, wurde zunächst 20 x mit einer 1 ml Spitze und anschließend 20 x mit einer 200  $\mu\text{l}$  Spitze trituiert. Die Suspension wurde zwei Minuten auf Eis stehen gelassen und danach durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 40  $\mu\text{m}$  gegeben. Zum Zählen wurden 10  $\mu\text{l}$  der Suspension eins zu zehn in Medium und anschließend eins zu eins mit Trypan Blau verdünnt. Pro Kavität einer sechs-Kavitäten-Platte wurden 50.000 Zellen pro ml in 4 ml NM ausgesät. Nach vier bis fünf Tagen wurde 50 % des Mediums durch frisches ersetzt. Sofern sich nach weiteren vier Tagen noch keine, mit bloßem Auge sichtbaren (50-100  $\mu\text{m}$ ), Sphären gebildet hatten, wurde nochmals die Hälfte des Mediums durch frisches NM + GF ersetzt. Nach Ausbildung der Neurosphären (ca. 200-300  $\mu\text{m}$  im Durchmesser) begann die Oligosphär-Induktion. Dazu wurde das NM schrittweise durch OM ersetzt, indem alle zwei bis drei Tage ein Viertel des Mediums gegen OM ausgetauscht wurde. Nach 19 Tagen konnten die entstandenen Oligosphären enzymatisch und mechanisch dissoziiert werden. Dazu wurde das Medium mit Oligosphären in ein 50 ml Schraubröhrchen überführt und bei 300 x g für drei Minuten herunter zentrifugiert. Nach einmaligem Waschen des Pellets mit PBS wurden 7 ml Accutase hinzugegeben und anschließend zehn Minuten bei 37  $^\circ\text{C}$  unter starkem Schütteln im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden 7 ml PBS hinzugefügt und nochmals zentrifugiert. Nach Zugabe von 1 ml Ausplattiermedium wurden die Oligosphären mittels einer 1 ml und einer 200  $\mu\text{l}$  Spitze dissoziiert. Zur Kultivierung der OVZ wurden die Platten mit PLO beschichtet und  $2,5 \times 10^4$  Zellen, je Kavität einer 24-Kavitäten-Platte bzw.  $1,5 \times 10^5$  Zellen je Kavität einer sechs-Kavitäten-Platte, ausplattiert. Am Folgetag wurde das Medium komplett gewechselt. Nach weiteren zwei bis drei Tagen wurden 50 % des Mediums gewechselt. Am Tag neun wurden die Zellen fixiert bzw. homogenisiert (siehe Kap. 4.3.7).

Zur Differenzierung von OVZ in reife Oligodendrozyten wurde die Substanz PD174265, ein *epidermal growth factor receptor* Inhibitor [51], verwendet. Mit 1  $\mu\text{M}$  Endkonzentration

PD174265 wurden die OVZ für vier Tage in Ausplattiermedium ohne Forskolin behandelt. Eine weitere Möglichkeit war die Kultivierung in *Oligodendrocyte Survival & Differentiation Medium* (OSDM) von P.Glia. Für beide Methoden wurden die OVZ vorher einmal mit PBS gewaschen. Nach vier Tagen (an Tag 13) konnten die Zellen homogenisiert werden.

#### 4.3.6.5 Isolation von primären hippokampalen Neuronen

##### **Papain Lösung:**

- 0,5 mg/ml Papain in PBS
- 10 mM Glukose
- 10  $\mu$ g/ml DNase

##### **Ausplattiermedium:**

- DMEMGlutaMAX™
- 100 U/ml Penicillin
- 100  $\mu$ g/ml Streptomycin
- 20 mM Glukose
- 10 % Pferdeserum

##### **Neuronen Medium:**

- 50 ml Neurobasal Medium
- 100 U/ml Penicillin
- 100  $\mu$ g/ml Streptomycin
- 1 ml B27
- 125  $\mu$ l 100x GlutaMAX
- 2,5  $\mu$ l 0,5 M Glutamat

##### **Neuronen Medium + Cytosin Arabinosid (AraC):**

- 84  $\mu$ l 6 mM AraC

Die Gehirne aus sechs bis acht P1 Mäusen wurden entnommen und in einer Schale mit eiskaltem HBSS gesammelt. Unter dem Stereomikroskop wurden die Hippocampi von umliegenden Gewebe und Meningen befreit. Zur Immobilisierung des Gehirns wurde das Zerebellum mithilfe einer spitzen Pinzette fixiert und anschließend mit der anderen Pinzette die Hemisphären vom Mittelhirn und vom Corpus callosum abgetrennt. Anschließend wurde eine spitze Pinzette vorsichtig zwischen die beiden Hemisphären geführt, das Corpus callosum durchtrennt und die Hemisphären vom Mittelhirn entfernt. Auf der Innenseite der Kortex wurden die Hippocampi

sichtbar und konnten leicht herausgeflippt werden. Alle Hippocampi wurden in eiskaltem HBSS gesammelt, in ein 50 ml Schraubröhrchen mit 5 ml Papain-Lösung überführt und im Wasserbad bei 37 °C für 30 Minuten stark schüttelnd inkubiert. Nach Zugabe von 5 ml Ausplattiermedium und einmaligem auf- und abpipettieren mit einer 5 ml Glaspipette wurde für drei Minuten bei 200 x g und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgenommen, da das Pellet sehr locker war, erneut 5 ml Ausplattiermedium hinzugegeben und nochmals zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde noch zweimal wiederholt. Das Pellet wurde in 2 ml Ausplattiermedium durch 20 x auf- und abpipettieren mit einer 1 ml und dann mit einer 200 µl Spitze dissoziiert. Nach Auffüllen mit Ausplattiermedium auf 14 ml wurden je 2 ml in eine Kavität einer sechs-Kavitäten-Platte gegeben und 500 µl in je vier Kavitäten einer 24-Kavitäten-Platte. Nach zwei bis vier Stunden hatten sich die Zellen angeheftet und Ausläufer gebildet. Anschließend wurde ein Mediumwechsel auf Neuronen Medium durchgeführt. Am nächsten Tag wurde die Hälfte des Mediums gegen Neuronen Medium + AraC ausgetauscht. Um tote Zellen zu entfernen, wurde der komplette Überstand zunächst steril filtriert und das gefilterte Medium eins zu eins mit Neuronen Medium + AraC gemischt und zu den Zellen gegeben. Nach drei Tagen wurde die Hälfte des Mediums gegen Neuronen Medium ohne AraC ausgetauscht und die Zellen dabei mit rhASA gefüttert (siehe Kap. 4.3.7). Am Folgetag wurden die Zellen homogenisiert.

### **4.3.7 Fütterung mit rhASA für Endozytose Versuche und Herstellung von Homogenaten**

#### **Azider Puffer pH 3:**

50 mM Glycin  
150 mM NaCl

Zur Verifizierung des Mechanismus, welches rhASA nutzt um in die Zelle zu gelangen, wurden Endozytose Versuche unter Zugabe verschiedener Inhibitoren durchgeführt. Dafür wurden je  $1,2 \times 10^5$  Zellen bzw.  $5 \times 10^5$  primäre Mikroglia je Vertiefung einer zwölf-Kavitäten-Platte in je 0,5 ml Medium ausgesät. Primärkulturen wurden, wie in Kapitel 4.3.6 beschrieben, ausgeteilt. Die Zellen wurden mit 5 µg/ml rhASA (li310, Shire) mit und ohne Zugabe verschiedener Inhibitoren gefüttert:

7,5 mM D-Mannose-6-Phosphat Mononatriumsalz (M6P)  
7,5 mM D-Glukose-6-Phosphat Mononatriumsalz (G6P)  
7,5 mM D-(+)-Mannose  
50 µg/ml Dextran Sulfat  
0,1 mg/ml Mannan

Nach  $\bar{u}N$  Inkubation wurden die Zellen homogenisiert bzw., wie in Kapitel 4.3.8 oder Kapitel 4.3.9 beschrieben, fixiert. Für die Zellhomogenisierung wurden diese einmal mit PBS und zweimal je drei Minuten mit einem aziden Puffer gewaschen, um an die Oberfläche gebundene rhASA zu entfernen. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und die Reaktion mit 5 % FCS in PBS abgestoppt. Die Kavität wurde nochmals mit PBS nachgespült und die Zellen bei 3000 x g für fünf Minuten bei 4 °C pelletiert. Anschließend wurde das Pellet zweimal mit PBS gewaschen und in 110  $\mu$ l 0,5 % Triton N-101 in TBS homogenisiert. Nach starkem Mischen des Homogenats mittels Vortexer und Ultraschallbehandlung für fünf Minuten, wurde es bei -20 °C eingefroren. Zur weiteren Verarbeitung wurde das aufgetaute Homogenat fünf Minuten bei 18.000 x g abzentrifugiert und der Überstand verwendet. Nach Durchführung einer Proteinbestimmung (siehe Kap. 4.2.3.2) wurden die einzusetzenden Verdünnungen für einen ELISA (siehe Kap. 4.2.3.3) in Homogenisierungspuffer mit 1 % BSA hergestellt.

#### 4.3.8 Fixierung von Zellen mit Paraformaldehyd

Um Zellen für längere Zeit zu konservieren, wurden sie fixiert. Dazu wurden die Zellen mit 4 % PFA in PBS kovalent miteinander vernetzt. Die Kulturzellen auf Deckgläsern wurden einmal mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde auf jedes Deckglas in den Vertiefungen einer 24-Kavitäten-Platte 300  $\mu$ l der Fixierungslösung gegeben. Die Fixierung wurde für 15 Minuten bei RT durchgeführt. Danach wurden die Deckgläser dreimal mit PBS gewaschen.

#### 4.3.9 Fixierung von Zellen mit Methanol

Zum Nachweis muriner ASA mittels N14-Antikörper (siehe Tab. 3.2) wurden die Zellen mit Methanol fixiert. Nach Waschen der Zellen mit PBS wurde -20 °C kaltes Methanol auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden sie für fünf Minuten bei -20 °C inkubiert und danach dreimal mit PBS gewaschen.

#### 4.3.10 Immunzytochemische Färbung

Zum Färben der Zellen wurden die Deckgläschen in eine dunkle, feuchte Kammer auf Parafilm gelegt, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Die fixierten Zellen wurden zunächst in die feuchte Kammer überführt und einmal mit PBS gewaschen. Unspezifische Bindestellen wurden durch  $\bar{u}N$  Inkubation bei 4 °C mit 10 % *Normal goat Serum* mit 0,1 % Triton X-100 in PBS blockiert. Nach Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers für 1,5 Stunden bei RT in 2 % BSA in PBS. Alle verwendeten Antikörper wurden zuvor drei Minuten bei 16000 x g zentrifugiert, um eventuell entstandene Aggregate zu pelletieren. Nach dreimaligen Waschen der Zellen wurden diese mit dem Sekundärantikörper und DAPI, welche in 2 % BSA in PBS vorlagen, für eine Stunde inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten wurden die

Deckgläser kurz in destilliertes Wasser eingetaucht, um Salze zu entfernen. Zuletzt wurden die Deckgläser mit ProLong Gold<sup>™</sup> (Invitrogen) eingedeckelt.

## 5 Ergebnisse

Die Enzyersatztherapie (EET), bei der mittels intravenöser Injektionen aktives Enzym appliziert wird, ist eine mögliche Therapieoption für lysosomale Speichererkrankungen (LSD). Eine effiziente EET von LSDs mit zentralnervöser Beteiligung, wie der metachromatischen Leukodystrophie (MLD), ist aufgrund der Bluthirnschranke (BHS) nicht möglich. Diese verhindert den Übertritt des applizierten Enzyms in das zentrale Nervensystem. Im Rahmen dieser Arbeit wurde, um die BHS zu umgehen, rekombinante humane Arylsulfatase A (rhASA) mittels osmotischer Minipumpen direkt in den lateralen Ventrikel von sechs Monaten alten MLD-Mäusen appliziert. Dabei wurde die rhASA kontinuierlich über einen Zeitraum von vier Wochen in die Zerebrospinalflüssigkeit abgegeben. Während der intrazerebroventrikulären EET (i.z.v. EET) wurden Verhaltensanalysen durchgeführt. Anschließend wurde die Verteilung der rhASA im Parenchym des Gehirns sowie die zelluläre Aufnahme der rhASA untersucht. Zudem wurden biochemische und histologische Analysen zur Abnahme der Sulfatidakkumulationen durchgeführt.

### 5.1 Charakterisierung der behandelten Mäuse

#### 5.1.1 Nebeneffekte von i.z.v. EET

Kurz nach Implantation der osmotischen Minipumpen sank das Gewicht der Mäuse, normalisierte sich aber im Laufe der vier Wochen wieder (nicht gezeigt). Nach Entnahme der Gehirne konnte kein Unterschied des Gehirngewichtes festgestellt werden (nicht gezeigt).

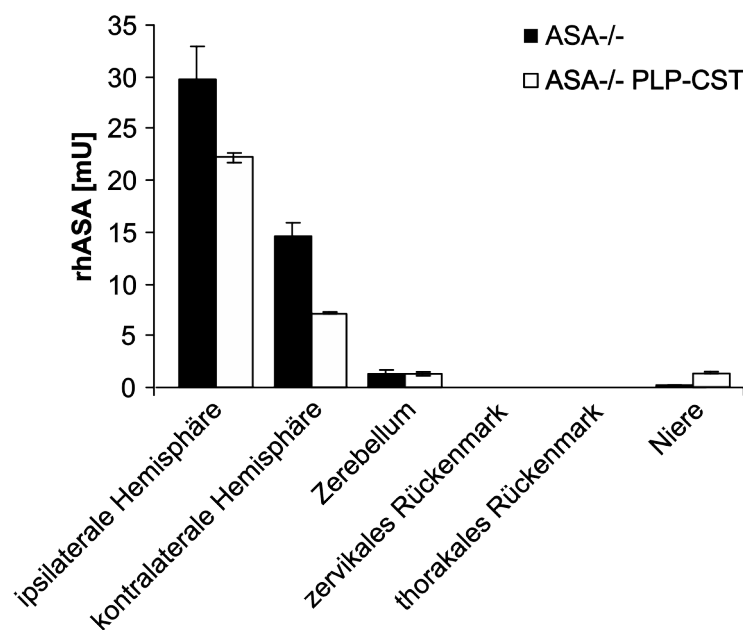
Die Infusion von rhASA in ASA-defiziente Mäusen ruft eine Immunantwort hervor [80]. Diese wurde verhindert, indem immuntolerante Mausstämme verwendet wurden, die eine inaktive hASAc69s exprimieren. Zur Detektion einer eventuellen Immunreaktion der Mäuse wurde der Antikörpertiter im Serum nach 4.2.3.7 von Dr. Ulrich Matzner bestimmt. Im Gegensatz zu ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen, denen 4 x 600 µg rhASA intravenös injiziert wurden, konnten bei mit i.z.v. EET behandelten ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen und immuntoleranten ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen keine Antikörper im Serum nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

### 5.1.2 Stabilität der rhASA in osmotischen Minipumpen

Nach Entnahme der Pumpen konnte ein Restvolumen von ca. 35 % der rhASA-Lösung im Pumpenreservoir festgestellt werden. Zur Analyse der rhASA Stabilität wurde von dem entnommenen Restvolumen ein ASA-Aktivitätstest (siehe Kap. 4.2.3.6) durchgeführt. Die Analyse der spezifischen Aktivität ergab eine Restaktivität von ca. 70 % der zu Beginn vorhandenen rhASA-Aktivität, was einer spezifischen Aktivität von 39,27 U/mg entspricht.

### 5.1.3 Ermittlung der rhASA Verteilung im Gewebe über Aktivitätsmessungen der Homogenate einzelner Regionen

Nach vier Wochen i.z.v. EET wurde die Verteilung der rhASA durch Aktivitätsmessungen (siehe Kap. 4.2.3.6) der Homogenate verschiedener Abschnitte des Gehirns und der Niere ermittelt. Getestet wurden die ipsilaterale und die kontralaterale Hemisphäre, das Zerebellum mit der Pons, das zervikale und thorakale Rückenmark und die Niere behandelter  $ASA^{-/-}$ - und  $ASA^{-/-}$  PLP-CST-Mäuse. Wie in Kapitel 4.2.3.5 beschrieben, wurde zunächst eine Immunpräzipitation der hASA durchgeführt. Anschließend wurde ein Aktivitätstest des Präzipitates durchgeführt, durch den nur die aktive, infundierte rhASA, nicht jedoch die inaktive hASAc69s, detektiert wurde. In Abbildung 5.1 ist die ermittelte Aktivität des Gesamthomogenats der ver-



**Abbildung 5.1: ASA-Aktivitätsbestimmung in Gewebekomogenaten.**

Zur Ermittlung der ASA-Verteilung im ZNS nach i.z.v. EET wurden von verschiedenen Abschnitten des ZNS Aktivitätsmessungen der Homogenate von behandelten  $ASA^{-/-}$ -Mäusen (schwarze Balken) und  $ASA^{-/-}$  PLP-CST-Mäusen (weiße Balken) durchgeführt. Untersucht wurden die ipsi- und kontralaterale Hemisphäre, das Zerebellum, zervikales und thorakales Rückenmark und, als Vertreter der peripheren Organe, die Niere. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 7-8$ )



schiedenen Gewebe und Regionen in mU aufgetragen. Es konnte gezeigt werden, dass die Menge an rhASA im ZNS von infundierter zu kontralateraler Hemisphäre, auch entlang der rostro-kaudalen Achse, abnahm. In der ipsilateralen Hemisphäre konnten 29,7 mU nachgewiesen werden, in der kontralateralen Hemisphäre noch 14,6 mU und im Zerebellum lediglich 1,4 mU. Im Rückenmark konnte keine rhASA nachgewiesen werden. Die Niere wies nur in den ASA<sup>-/-</sup> PLP-CST-Mäusen etwa 1,5 mU auf. Bezogen auf die spezifische Restaktivität von 39,27 U/mg der rhASA in dem Pumpenreservoir (siehe Kap. 5.1.2) konnten im Gehirn der ASA<sup>-/-</sup>-Mäuse lediglich 1,14 µg nachgewiesen werden und bei ASA<sup>-/-</sup> PLP-CST-Mäusen nur 0,77 µg.

### 5.1.4 Halbwertszeit der rhASA im Gewebe

Die Halbwertszeit (HWZ) der rhASA im ZNS wurde wie folgt berechnet:

$$t_{1/2} = \frac{M_{ASA} \ln(2)}{k_0}$$

wobei  $M_{ASA}$  der ermittelten Endmenge (1,14 µg bzw. 0,77 µg pro Gehirn siehe Kap. 5.1.3) und  $k_0$  der Zuflussrate von 0,25 µl pro Stunde entspricht. Für die HWZ der beiden Modelle ergeben sich also: für ASA<sup>-/-</sup>-Mäuse

$$t_{1/2} = \frac{1,14 \ln(2)}{0,25 \text{ std}} = 3,2 \text{ std}$$

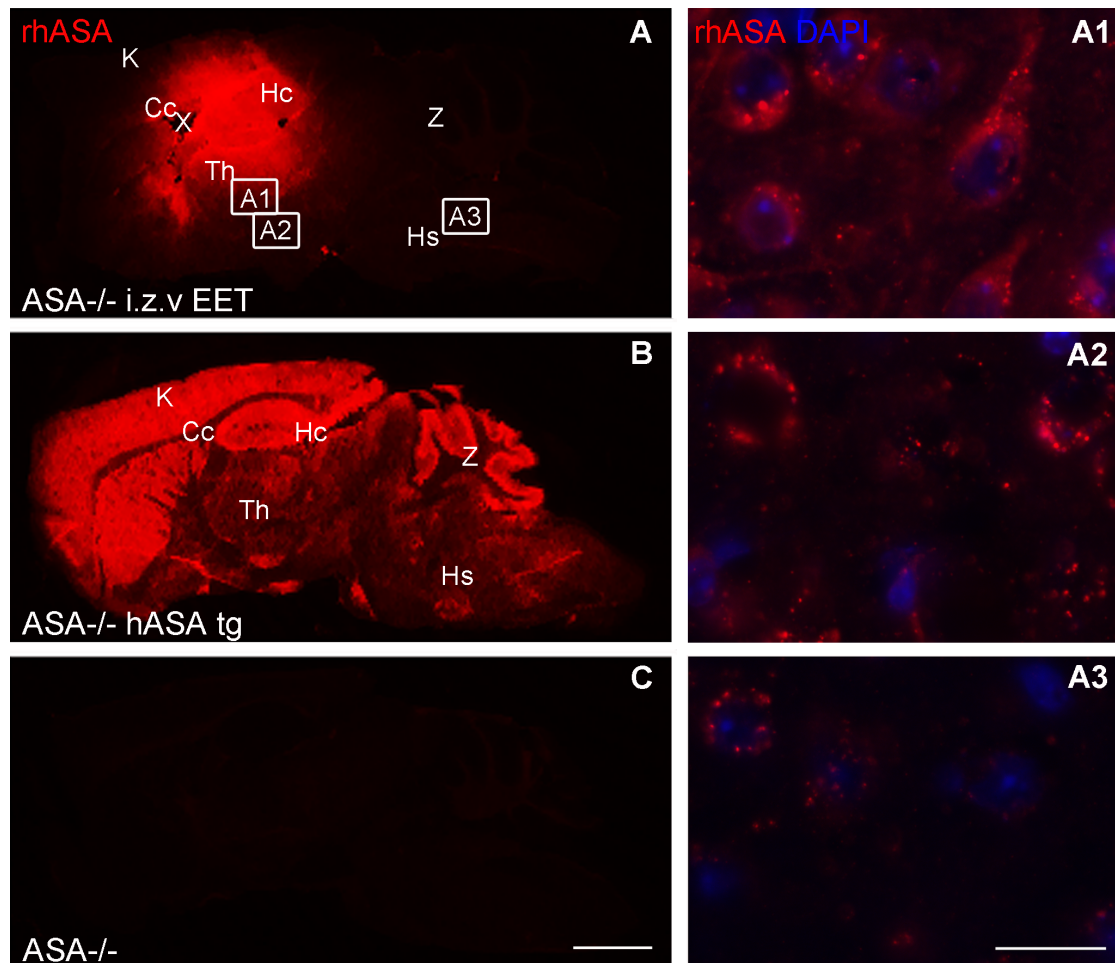
und für ASA<sup>-/-</sup> PLP-CST-Mäuse.

$$t_{1/2} = \frac{0,77 \ln(2)}{0,25 \text{ std}} = 2,1 \text{ std}$$

Die HWZ der rhASA im ZNS entspricht demnach 2,1-3,2 Stunden.

### 5.1.5 Ermittlung der rhASA Verteilung im Gewebe mittels Immunhistochemie

Nach Kapitel 4.2.2.3 wurden Gefrierschnitte angefertigt und die rhASA mit einem affinitätsgereinigten Antikörper gegen humane ASA (PFA-affi, siehe Tab. 3.2) immunhistochemisch detektiert. Abbildung 5.2 zeigt die Färbung von rhASA in sagittalen Gefrierschnitten des Gehirns verschiedener Mäuse (siehe Tab. 4.1). Für die Bildgebung wurde der FLA-5100 Fluorescence Scanner von Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan verwendet. In Abbildung 5.2 A ist die Färbung einer behandelten ASA<sup>-/-</sup>-Maus zu sehen. Als Positivkontrolle diente die Färbung der in B dargestellten immuntoleranten ASA<sup>-/-</sup>-Maus. Abbildung C zeigt als Negativkontrolle die Färbung einer unbehandelten ASA<sup>-/-</sup>-Maus. In Abbildung 5.2 A ist zu sehen, dass die infundierte rhASA das Ependym des lateralen Ventrikels überwinden und sich im Gewebe um den lateralen Ventrikel verteilen konnte. In dieser Übersichtsaufnahme ist eine Verteilung der in-



**Abbildung 5.2: Immunhistochemische Färbung von rhASA in sagittalen Gefrierschnitten des Gehirns.**

Zur Überprüfung der Verteilung der infundierten rhASA (rot) im Gewebe wurden immunhistochemische Färbung von rhASA in sagittalen Gefrierschnitten des Gehirns durchgeführt. Zur Detektion von rhASA wurde der affinitätsgereinigte, polyklonale Kaninchen-anti-hASA Antikörper (PFA-affi) und der Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 benutzt. A: Behandelte  $ASA^{-/-}$ -Maus X = Injektionsstelle, K = Kortex, Cc = Corpus callosum, Hc = Hippocampus, Th = Thalamus, Z = Zerebellum Hs = Hirnstamm. A1-A3: Vergrößerungen der in A gekennzeichneten Abschnitte. B: Immuntolerante  $ASA^{-/-}$ -Maus als Positivkontrolle. C: Unbehandelte  $ASA^{-/-}$ -Maus als Negativkontrolle. Die Konzentration der rhASA nimmt mit erhöhtem Abstand zur Injektionsstelle ab. Der Maßstabsbalken A-C entspricht 1,5 mm A1-3 entspricht 20  $\mu\text{m}$ . In blau ist die Kernfärbung mittels DAPI gezeigt. Modifiziert nach Stroobants und Gerlach *et al.* 2011 [117].

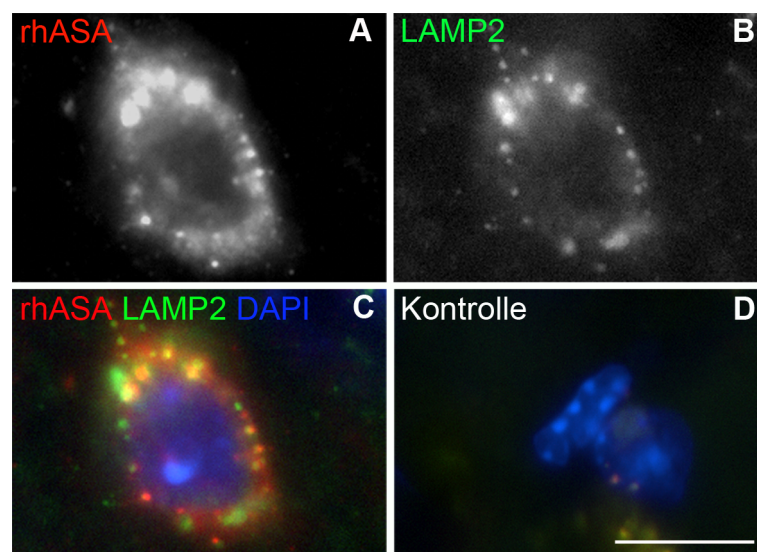
fundierten rhASA von der Injektionsstelle X dorsal zum Kortex und ventral zum Thalamus zu erkennen. Vergrößerungen der in Abbildung 5.2 A gekennzeichneten Abschnitte A1-A3 zeigen eine detailliertere Verteilung der infundierten rhASA. Die Konzentration der rhASA nimmt mit erhöhtem Abstand zur Injektionsstelle ab, konnte aber auch in weiterer Entfernung zur Injektionsstelle, wie dem Hirnstamm, nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.2 A3). Abbildung A1 zeigt einen Ausschnitt des Thalamus, in dem die rhASA sowohl lysosomal um den Zellkern detektiert wurde, als auch im Parenchym. Weiter ventral (siehe Abb. 5.2 A2) ist die rhASA fast

ausschließlich lysosomal sortiert wie die charakteristische Verteilung um den Kern indiziert. Im Hirnstamm (siehe Abb. 5.2 A3) war nur noch sehr wenig rhASA detektierbar. Diese wurde aber internalisiert und auch lysosomal sortiert.

Die Positivkontrolle (siehe Abb. 5.2 B) zeigt die Verteilung der inaktiven c69s-hASA im gesamten Gehirn. Im Kortex, Hippocampus und im Zerebellum wurde diese stärker exprimiert als im restlichen Gehirn. In der Negativkontrolle (siehe Abb. 5.2 C) konnte keine ASA nachgewiesen werden.

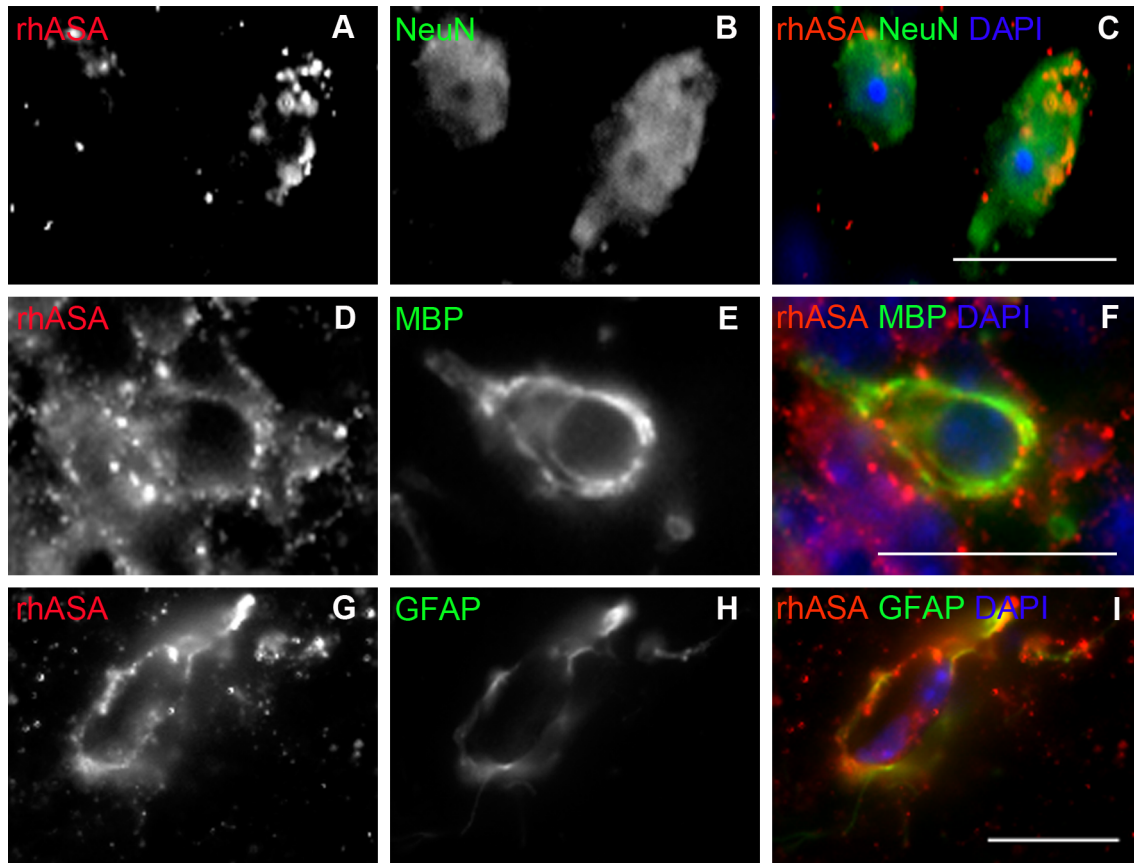
### 5.1.6 Zellspezifische Aufnahme und lysosomale Sortierung der rhASA

Welche Zellen die infundierte rhASA endozytierten und ob diese lysosomal sortiert wurde, wurde ebenfalls an sagittalen Gefrierschnitten des Gehirns gezeigt. Um eine Kreuzreaktion mit inaktiver hASAc69s zu verhindern, wurden mit i.z.v. EET behandelte ASA<sup>-/-</sup>-Mäuse ohne das hASAc69s Transgen verwendet. Die in Abbildung 5.3 gezeigte Ko-Färbung mit dem lysosomalen, endosomalen Protein LAMP2 bestätigt die lysosomale Sortierung der rhASA. Die in Abbildung 5.3 D gezeigte Kontrolle zeigt einen diffus verteilten, leichten Hintergrund sowohl im roten als auch im grünen Kanal.



**Abbildung 5.3: Immunhistochemische Färbung von rhASA und LAMP2 in sagittalen Gefrierschnitten des Gehirns.**

Zur Überprüfung der lysosomalen Sortierung von infundierter rhASA wurden sagittale Gefrierschnitte des Gehirns einer behandelten ASA<sup>-/-</sup>-Maus immunhistochemisch gefärbt. Zur Detektion von rhASA (rot) wurde der affinitätsgereinigte, polyklonale Kaninchen-anti-hASA Antikörper (PFA-affi) und der Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 benutzt. Lysosomen (grün) wurden mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen das lysosomale, endosomale Protein LAMP2 gerichtet ist (Abl-93) und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Ratte-DyLight 488 detektiert. Die Kontrolle wurde nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. A: Detektion infundierter rhASA. B: Detektion von LAMP2. C: Überlagerung der beiden Kanäle zusammen mit DAPI. D: Sekundärantikörperkontrolle. Der Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .



**Abbildung 5.4: Ko-Färbung von rhASA und verschiedenen Zellmarkern in Gefrierschnitten des Gehirns einer  $ASA^{-/-}$ -Maus.**

Sagittale Gefrierschnitte des Gehirns einer  $ASA^{-/-}$ -Maus wurden, zur Ermittlung welche Zelltypen die administrierte rhASA endozytierten, immunzytochemisch gefärbt. Zur Detektion von rhASA (rot) wurde der affinitätsgereinigte, polyklonale Kaninchen-anti-hASA Antikörper (PFA-affi) und der Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 benutzt. Neurone (grün) wurden mit einem Antikörper, der gegen NeuN gerichtet ist und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-Alexa Fluor 488 detektiert. Oligodendrozyten (grün) wurden mit einem Antikörper, der gegen MBP gerichtet ist und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Ratte-DyLight 488 detektiert. Astrozyten (grün) wurden mit einem Antikörper, der gegen GFAP gerichtet ist und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-Alexa Fluor 488 detektiert. A-C: Ko-Färbung von rhASA und NeuN A: rhASA. B: NeuN. C Überlagerung beider Kanäle mit DAPI. D-F: Ko-Färbung von rhASA und MBP. D: rhASA. E: MBP. F: Überlagerung beider Kanäle mit DAPI. G-I: Ko-Färbung von rhASA mit GFAP. G: rhASA. H: GFAP. I: Überlagerung beider Kanäle mit DAPI. Der Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ . Modifiziert nach Stroobants und Gerlach *et al.* 2011 [117].

Um zu Untersuchen, welche Zelltypen die infundierte rhASA endozytierten, wurden Ko-Färbungen von rhASA und verschiedenen Zellmarkern an Gefrierschnitten des Gehirns einer behandelten  $ASA^{-/-}$ -Maus durchgeführt. Ko-Färbungen von rhASA und den Zellmarkern NeuN für Neurone, MBP für Oligodendrozyten und GFAP für Astrozyten konnten zeigen, dass die rhASA von all diesen Zelltypen endozytiert wurde (siehe Abb. 5.4). Neurone (siehe Abb. 5.4 A-C) zeigten eine Aufnahme der ASA und deren Anreicherung um den Zellkern, was auf lysosomale Sortierung hindeutet. Eine Ko-Färbung von MBP und rhASA ist in Abbildung 5.4

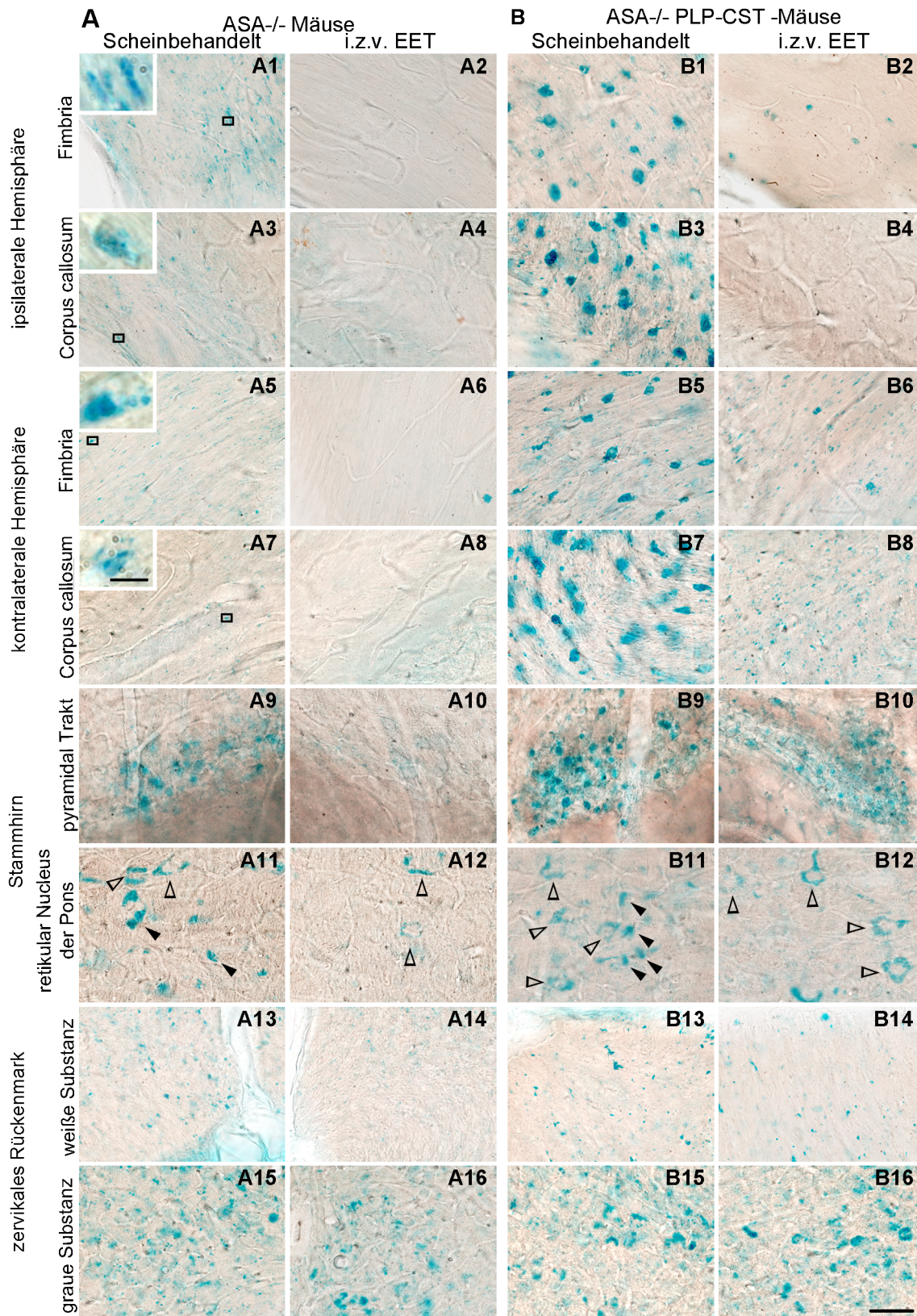
D-F gezeigt mit einer Lokalisation der rhASA um den Zellkern. In Abbildung 5.4 G-I sind Astrozyten um ein Blutgefäß gezeigt. Auch diese zeigten eine Aufnahme der ASA und eine perinukleäre Lokalisation.

### 5.1.7 Detektion des Speichermaterials Sulfatid mittels Alzianblau-Färbung

Um eine Reduktion der Sulfatidakkumulation zu untersuchen, wurde eine Alzianblau-Färbung (siehe Kap. 4.2.2.2) an 100  $\mu\text{m}$  dicken Vibratomschnitten (siehe Kap. 4.2.2.1) durchgeführt. Dazu wurden Glutaraldehyd fixierte Gehirne immuntoleranter, scheinbehandelter und behandelter MLD-Mäuse verwendet (siehe Tab. 4.1). Als Kontrolle dienten WT-Mäuse die keine Speicherung und somit auch keine Färbung, aufwiesen (nicht gezeigt). Abbildung 5.5 zeigt vergleichende Färbungen von Schnitten scheinbehandelter und behandelter  $\text{ASA}^{-/-}$ -Mäuse (siehe Abb. 5.5 A) sowie  $\text{ASA}^{-/-}$  PLP-CST-Mäuse (siehe Abb. 5.5 B). An scheinbehandelten MLD-Mäusen fällt zunächst das unterschiedliche Muster des Speichermaterials auf. Es wurde gezeigt, dass die Morphologie des Speichermaterials je nach Zelltyp unterschiedlich ist [77].

Das kleinere, punktuelle alzianophile Material ist charakteristisch für Oligodendrozyten, größeres alzianophiles Material ist typisch für Phagozyten und das gekrümmte alzianophile Material (vgl. Abb. 5.5 A11 offene Pfeilspitzen) entspricht einer neuronalen Speicherung. In scheinbehandelten  $\text{ASA}^{-/-}$ -Mäusen dominierte Oligodendroglia-typisches Speichermaterial, wohingegen bei scheinbehandelten  $\text{ASA}^{-/-}$  PLP-CST-Mäusen das Phagozyten-typische Speichermuster dominierte. In beiden Modellen nahm die Speicherung der ipsilateralen Hemisphäre nahezu vollständig ab, wie am Beispiel der Fimbria (siehe Abb. 5.5 A2 und B2) und des Corpus callosums (siehe Abb. 5.5 A4 und B4) zu sehen ist. Auch in der kontralateralen Hemisphäre der  $\text{ASA}^{-/-}$ -Mäuse (siehe Abb. 5.5 A6 und B8) war die Speicherung nahezu komplett verschwunden. In der kontralateralen Hemisphäre der  $\text{ASA}^{-/-}$  PLP-CST-Mäuse (siehe Abb. 5.5 B6 und B8) war nur das punktuelle, kleinere alzianophile Material zu detektieren. Das größere, alzianophile Material wurde degradiert. Diese zelltypspezifischen Unterschiede zeigten sich auch im Stammhirn (siehe Abb. 5.5 A9 - B12). Dort profitierten ebenfalls Phagozyten von der i.z.v. EET (gekennzeichnet mit geschlossenen Pfeilspitzen in A11 - B12), die Speicherung, charakteristisch für Neurone (siehe Abb. 5.5 offene Pfeilspitzen in A11 - B12), blieb bestehen. Im Pyramidaltrakt der Pons war die Speicherung nur in  $\text{ASA}^{-/-}$ -Mäusen vermindert (siehe Abb. 5.5 A10). Im zervikalen Rückenmark war die Speicherung in der weißen, jedoch nicht in der grauen Substanz verringert (siehe Abb. 5.5 A14 und B14). Dort blieb die Speicherung, typisch für Phagozyten, bestehen.





**Abbildung 5.5:** Alzianblau-Färbung an Vibratomschnitten von immuntoleranten, scheinbehandelten und behandelten, ASA<sup>-/-</sup> und ASA<sup>-/-</sup> PLP-CST-Mäusen. Gezeigt ist das mittels Alzianblau angefärbte Speichermaterial von scheinbehandelten und behandelten ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen (A) und ASA<sup>-/-</sup> PLP-CST-Mäusen (B). Verglichen werden verschiedene Regionen des ZNS. Die offenen Pfeilspitzen in der Pons markieren Neurone, die geschlossenen Pfeilspitzen Phagozyten, zu erkennen anhand des Speicherungsmusters. Maßstabsbalken 50  $\mu$ m, Vergrößerungen 5  $\mu$ m, n = 3. Modifiziert nach Stroobants und Gerlach *et al.* 2011 [117].

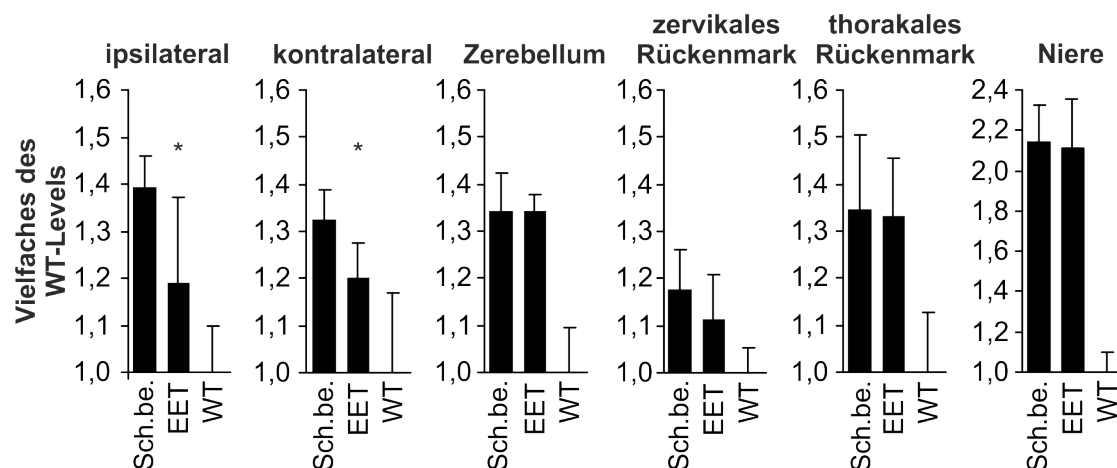
### 5.1.8 Lipidanalytik mittels Dünnschichtchromatografie

Um das therapeutische Potential der i.z.v. EET zu bewerten, wurde die Abnahme der Sulfatidspeicherung in einzelnen ZNS Abschnitten von immuntoleranten  $ASA^{-/-}$ - und  $ASA^{-/-}$  PLP-CST-Mäusen nach vierwöchiger Behandlung untersucht. Nach transkardialer Perfusion der Tiere mit PBS (siehe Kap. 4.2.1) wurden verschiedene Gehirnareale präpariert. Aus Homogenaten dieser Gewebe (siehe Kap. 4.2.3.1) wurden anschließend Lipide extrahiert (siehe Kap. 4.2.3.8) und diese chromatografisch aufgetrennt (siehe Kap. 4.2.3.9). Die Dünnschichtchromatografien wurden densitometrisch ausgewertet und die ermittelten Sulfatidwerte auf die entsprechenden Cholesterolverte durch Quotientenbildung normiert. Die WT-Werte wurden auf den Wert eins festgelegt und somit die Werte von behandelten und scheinbehandelten Mäusen als ein vielfaches der WT-Werte aufgetragen. Zur Ermittlung der Reduktion des gespeicherten Sulfatids wurden die behandelten und scheinbehandelten Mäuse miteinander verglichen. Es konnten Unterschiede der Sulfatidkonzentration zwischen scheinbehandelten MLD-Mäusen und WT-Mäusen gezeigt werden (siehe Abb. 5.6). Sowohl scheinbehandelte  $ASA^{-/-}$ - als auch  $ASA^{-/-}$  PLP-CST-Mäuse wiesen einen um 1,3-1,4fachen bzw. um 1,9-2,1fachen erhöhten Sulfatidspiegel im ZNS und der Niere auf.

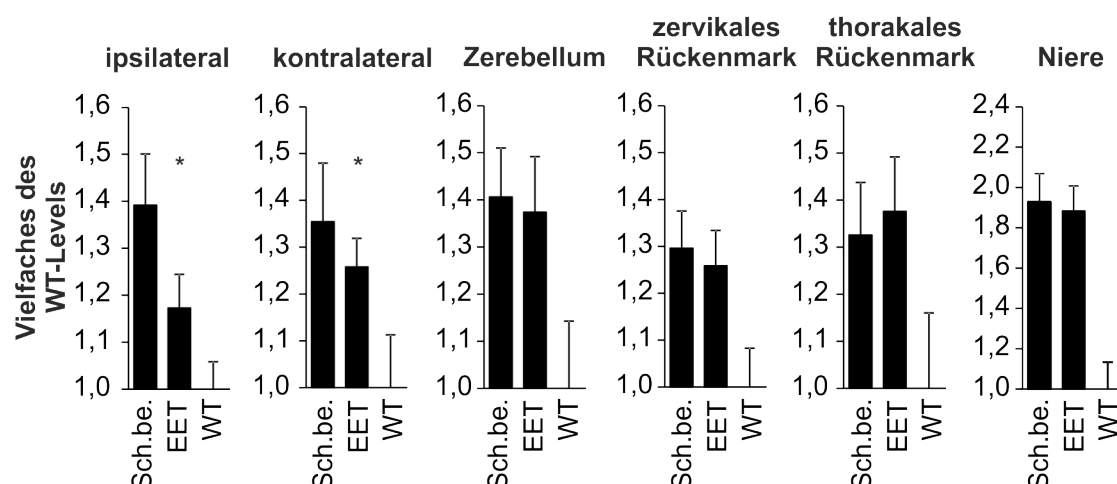
$ASA^{-/-}$ -Mäuse (siehe Abb. 5.6 A) zeigten eine 51,42 % Sulfatidreduktion in der ipsilateralen Hemisphäre ( $p = 0,008$ ) im Vergleich zu scheinbehandelten  $ASA^{-/-}$ -Mäusen. In der kontralateralen Hemisphäre lag die signifikante ( $p = 0,0027$ ) Abnahme bei 38,18 %. Im Zerebellum war keine Abnahme der Speicherung nachzuweisen. Im zervikalen und thorakalen Rückenmark sowie der Niere konnte keine Abnahme nachgewiesen werden.

In der ipsilateralen Hemisphäre von  $ASA^{-/-}$  PLP-CST-Mäusen (siehe Abb. 5.6 B) konnte eine signifikante ( $p = 0,005$ ) Reduktion der Sulfatidspeicherung von 54,2 % festgestellt werden. Die kontralaterale Hemisphäre zeigte eine Abnahme von 27,32 % die signifikant war ( $p = 0,045$ ). Im Zerebellum, dem zervikalen und thorakalen Rückenmark sowie der Niere zeigten sich keine signifikanten Verminderungen der Sulfatidspeicherung.

### A Immuntolerante ASA<sup>-/-</sup>-Mäuse



### B Immuntolerante ASA<sup>-/-</sup> PLP-CST-Mäuse



**Abbildung 5.6:** Densitometrische Auswertung des mit dünnschichtchromatografisch ermittelten Sulfatidgehalts im ZNS und der Niere.

Immuntolerante ASA<sup>-/-</sup> und ASA<sup>-/-</sup> PLP-CST-Mäuse wurden mit i.z.v. EET vier Wochen lang behandelt und die Sulfatid- und Cholesterol-Mengen in unterschiedlichen Geweben mittels Dünnschichtchromatographie bestimmt. A: Vergleich des Sulfatidgehalts zwischen scheinbehandelten (Sch.be.) und behandelten (EET) ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen in verschiedenen Abschnitten des ZNS sowie der Niere. B: Vergleich des Sulfatidgehalts zwischen scheinbehandelten (Sch.be.) und behandelten (EET) ASA<sup>-/-</sup> PLP-CST-Mäusen in verschiedenen Abschnitten des ZNS und der Niere. Aufgetragen ist das Vielfache des WT-Gehaltes des Quotienten aus Sulfatid und Cholesterol. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 7$ ). WT-Mäuse wurden als eins definiert. Statistisch signifikante Abnahmen sind mit einem Stern markiert (t-Test,  $p \leq 0,05$ ).

## 5.2 Endozytosefähigkeit primärer, muriner Gehirn-Zellen

Die histologische Analyse der mit i.z.v. EET behandelten ASA<sup>-/-</sup>-Mäuse ergab unterschiedliche Erfolge der Therapie, abhängig vom Zelltyp (siehe Abb. 5.5). Aus diesem Grund wurde die Effektivität der Endozytose von rhASA in verschiedenen zellulären Systemen untersucht.

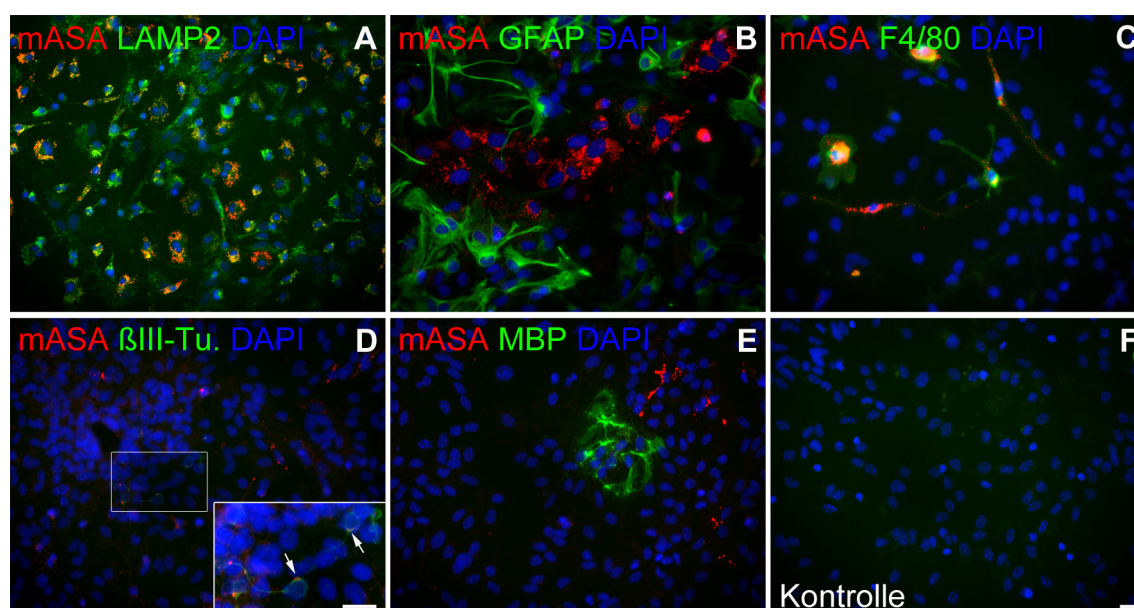


Folgende zelluläre Systeme wurden untersucht: primäre, neuronale Mischkulturen, primäre Mikrogliä, primäre Astrozyten bzw. die ASA-defiziente Zelllinie 17/- A1, primäre Neurone sowie primäre OVZ. Zusätzlich sollten Rezeptoren identifiziert werden, über die die rhASA in die Zellen gelangt. Alle beschriebenen Zelltypen wurden, wie in 4.3.7 beschrieben,  $\bar{u}N$  mit 5  $\mu g/ml$  ASA unter Zugabe verschiedener Inhibitoren gefüttert und am Folgetag mit einem aziden Puffer gewaschen (siehe Kap. 4.3.7), um an die Oberfläche gebundene ASA zu entfernen. Danach wurden die Zellen fixiert (siehe Kap. 4.3.8) für eine anschließende Detektion von rhASA bzw. Kap. 4.3.9 für eine anschließende Detektion von mASA-2 x Strep), um die zelluläre Sortierung mittels Immunzytochemie (siehe Kap. 4.3.10) zu charakterisieren, bzw. wie in Kapitel 4.2.3.1 beschrieben, homogenisiert und ein ELISA (siehe Kap. 4.2.3.3), zur Bestimmung der endozytierten Menge an ASA, durchgeführt. Zur Bestimmung der endozytierten Menge an rhASA in Zellen wurden, wenn nicht anders erwähnt, zwei unabhängige Versuche mit dreifach-Bestimmung durchgeführt.

### **5.2.1 Untersuchung der Endozytose von rhASA in primären, neuronalen Mischkulturen des Gehirns**

Welche neuronalen Zellen fähig zu einer MPR300-abhängigen Endozytose sind, wurde zunächst durch Fütterung von neuronalen Mischkulturen überprüft. Nach Kapitel 4.3.6.1 isolierte Zellen wurden  $\bar{u}N$  mit 5  $\mu g/ml$  rhASA oder mit mASA-2 x Strep (siehe Kap. 8.1), unter Zugabe von 7,5 mM G6P/M6P, inkubiert. Abbildung 5.7 zeigt Ko-Färbungen verschiedener Zellmarker bzw. dem lysosomalen, endosomalen Marker LAMP2 und mASA-2 x Strep in neuronalen Mischkulturen von ASA<sup>-/-</sup>-Zellen. Die Färbung von neuronalen Mischkulturen, gefüttert mit rhASA, ist nicht gezeigt, lieferte aber ähnliche Ergebnisse in Bezug auf Menge der Aufnahme und den ASA endozytierenden Zelltypen. Die Ko-Färbung von LAMP2 und mASA-2 x Strep in Abbildung 5.7 A weist auf eine lysosomale Sortierung der mASA-2 x Strep nach Endozytose hin. Dominierend in diesem Zellmodell waren deutlich Astrozyten (GFAP) (siehe Abb. 5.7 B) und Mikrogliä (F4/80) (siehe Abb. 5.7 C). Nur wenige Neurone (ßIII-Tubulin) (siehe Abb. 5.7 D) und Oligodendrozyten (MBP) (siehe Abb. 5.7 E) waren vorhanden. Die Ko-Färbung von Astrozyten oder Oligodendrozyten mit mASA-2 x Strep zeigte keine Kolo-kalisation. In Mikrogliä konnte allerdings viel ASA detektiert werden. Auch Neurone zeigten eine geringe Aufnahme von rhASA. Gezeigt ist in Abbildung 5.7 F die Sekundärantikörperkontrolle für murine Primärantikörper. Die Kontrolle für Sekundärantikörper gegen Primärantikörper aus Ratte sah ähnlich aus (nicht gezeigt). Ein Unterschied zwischen neuronalen Mischkulturen aus WT- oder ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen sowie Fütterung mit rhASA oder mASA-2 x Strep konnte nicht festgestellt werden.

Nach Kompetition der MPR300 vermittelten Endozytose durch M6P konnten weiterhin vereinzelt Zellen detektiert werden, die ASA positiv waren (siehe Abb. 5.8 B und F). Eine Ko-Färbung von Mikrogliä und ASA konnte zeigen, dass Mikrogliä, trotz Kompetition des

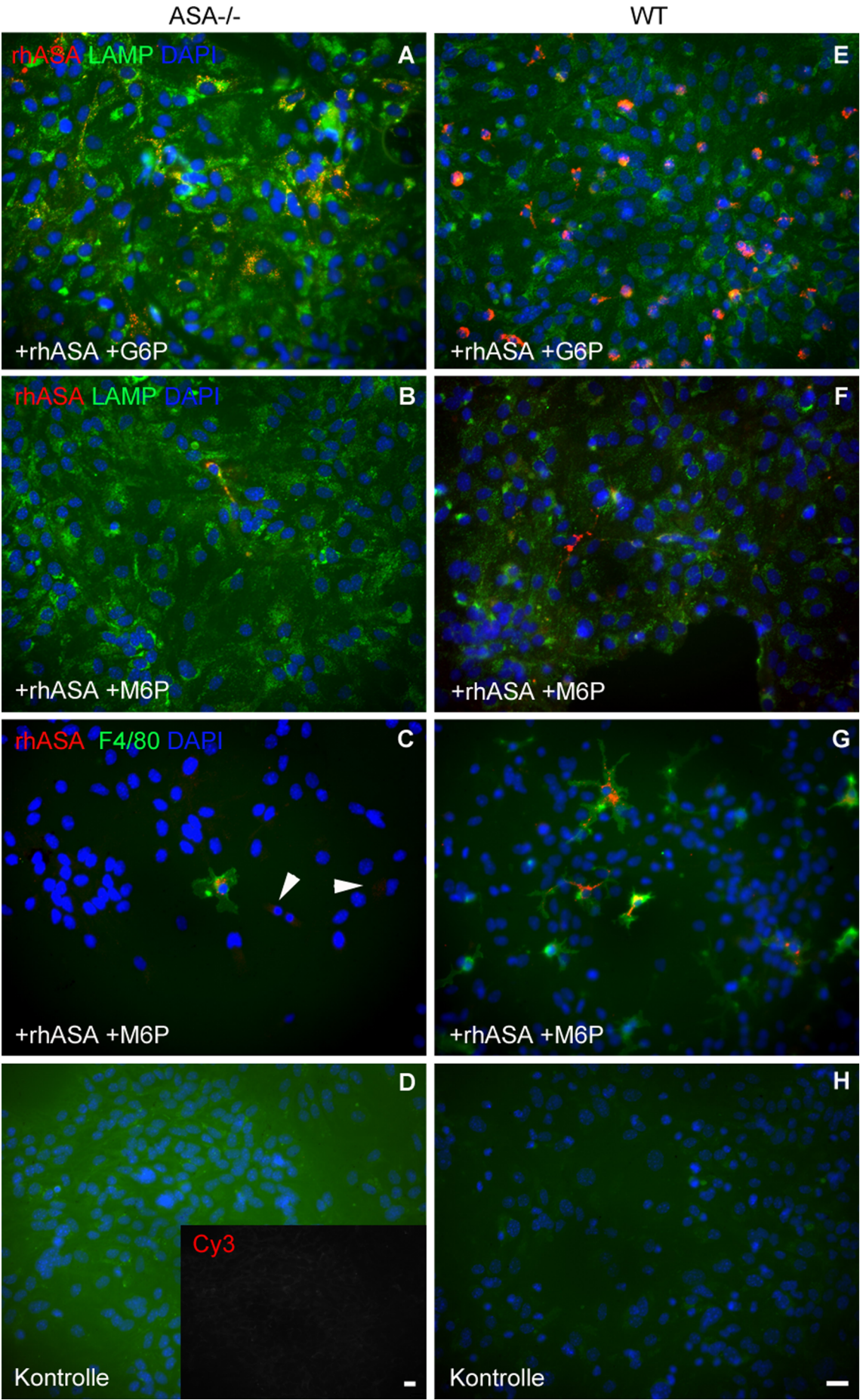


**Abbildung 5.7: Immunzytochemische Färbung einer mit mASA-2 x Strep gefütterten neuronalen Mischkultur aus ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

Welche Zellen einer neuronalen Mischkultur mASA-2 x Strep endozytieren und wie diese sortiert wird, wurde durch eine immunzytochemische Ko-Färbung von ASA und verschiedenen Zellmarkern bzw. dem lysosomalen, endosomalen Marker LAMP2 überprüft. Zur Detektion von mASA-2 x Strep (rot) wurde der polyklonale Kaninchen-anti-ASA Antikörper (N14) und der Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 benutzt. Lysosomen (grün) wurden mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen das lysosomale, endosomale Protein LAMP2 gerichtet ist (Abl-93) und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Ratte-DyLight 488 detektiert. Astrozyten (grün) wurden mit einem Antikörper, der gegen GFAP gerichtet ist und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-Alexa Fluor 488 detektiert. Mikroglia (grün) wurden mit einem Antikörper, der gegen F4/80 gerichtet ist und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Ratte-DyLight 488 detektiert. Neurone (grün) wurden mit einem Antikörper, der gegen βIII-Tubulin gerichtet ist und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-Alexa Fluor 488 detektiert. A: Ko-Färbung von LAMP2 und mASA-2 x Strep. B: Ko-Färbung von GFAP für Astrozyten und mASA-2 x Strep. C: Ko-Färbung von F4/80 für Mikroglia und mASA-2 x Strep. D: Ko-Färbung von Neuronen und mASA-2 x Strep, weiß umrandet die Vergrößerung eines Ausschnitts der βIII-Tubulin positive Neurone zeigt. E: Ko-Färbung von MBP für Oligodendrozyten und mASA-2 x Strep. F: Für die Kontrolle wurden nur die Sekundärantikörper verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 20 μm.

MPR300, rhASA endozytierten (siehe Abb. 5.8 C und G). Die Rotfärbung in Kernnähe bei gefütterten, mit M6P kompetitierten Zellen (siehe Abb. 5.8 C, Pfeilkopf) ist auf die Hintergrundfluoreszenz bei neuronalen Mischkulturen aus ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen im roten Kanal zurückzuführen, wie in der Sekundärantikörperkontrolle gezeigt ist (siehe Abb. 5.8 D, Box).

Bei der hier gezeigten Präparation der neuronalen Mischkultur aus ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen waren weniger Mikroglia als in der gezeigten neuronalen Mischkultur aus WT-Mäusen. Die Anzahl der einzelnen Zelltypen variierte allerdings von Präparation zu Präparation und gibt keinen Hinweis auf die tatsächliche Verteilung der Zellen in den verschiedenen Mausmodellen.



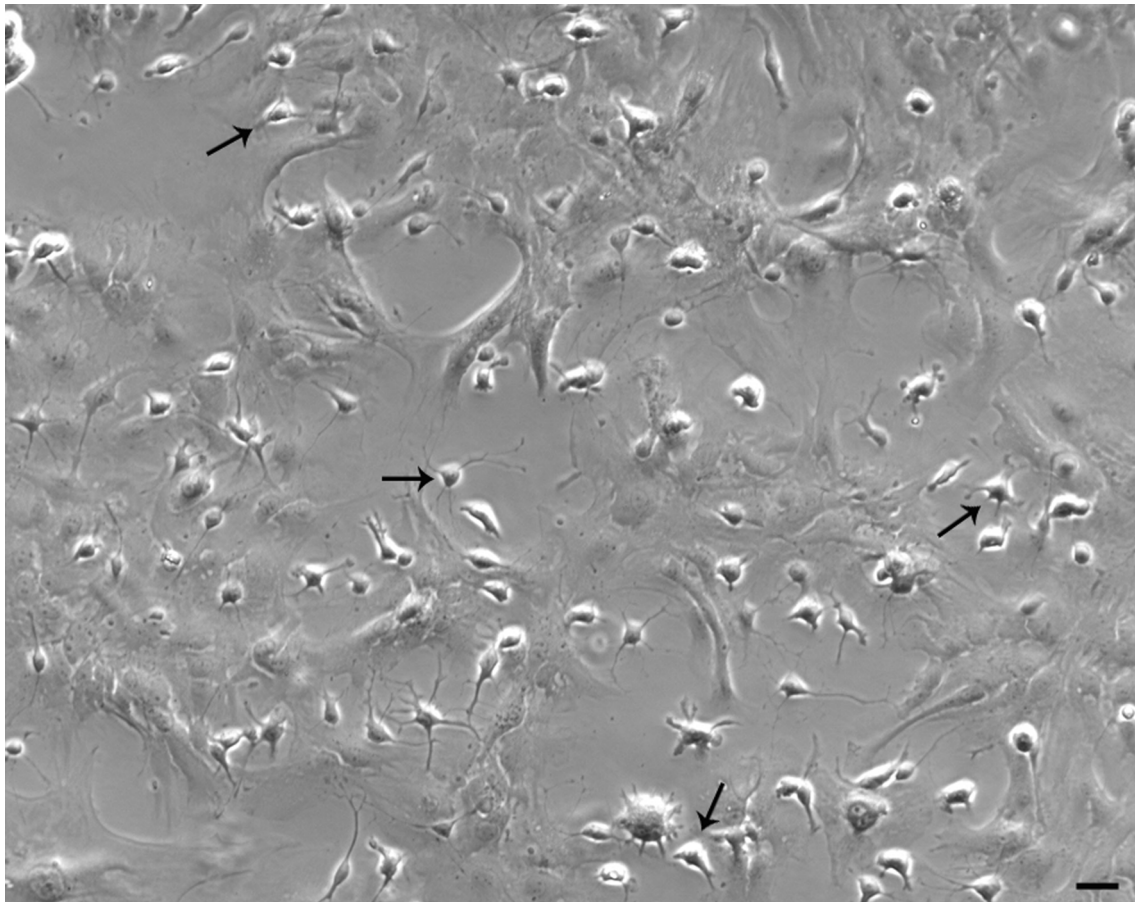


### Abbildung 5.8: Endozytose nach MPR300 Kompetition in Mikroglia einer neuronalen Mischkultur.

Immunzytochemische Färbung, von mit rhASA gefütterten, neuronalen Mischkulturen von LAMP2, rhASA und Mikroglia mit und ohne Kompetition durch M6P. Zur Detektion von rhASA (rot) wurde der affinitätsgereinigte, polyklonale Kaninchen-anti-ASA Antikörper (PFA-affi) und der Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 benutzt. Lysosomen (grün) wurden mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen das lysosomale, endosomale Protein LAMP2 gerichtet ist (Abl-93) und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Ratte-DyLight 488 detektiert. Mikroglia (grün) wurden mit einem Antikörper, der gegen F4/80 gerichtet ist und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Ratte-DyLight 488 detektiert. A-D: Neuronale Mischkultur aus ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen. G-H: Neuronale Mischkultur aus WT-Mäusen. A und E: Ko-Färbung von LAMP2 und rhASA in mit G6P gefütterten, neuronalen Mischkulturen. B und F: Ko-Färbung von LAMP2 und rhASA in mit M6P gefütterten, neuronalen Mischkulturen. C und G: Ko-Färbung von F4/80 und rhASA in mit M6P gefütterten, neuronalen Mischkulturen. D und H: Für die Kontrolle wurden nur die Sekundärantikörper verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

### 5.2.2 Endozytose von rhASA in primäre Mikroglia

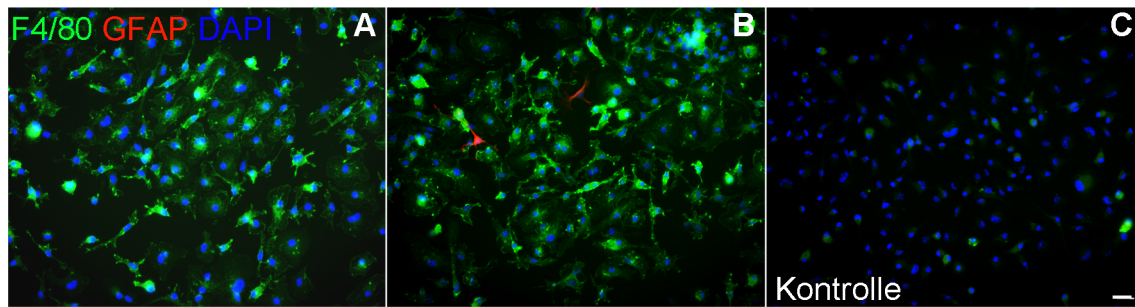
Zur Untersuchung der Endozytose von ASA in Mikroglia mussten diese erst einmal, wie in Kapitel 4.3.6.2 beschrieben, von der neuronalen Mischkultur isoliert werden. Nach 12-14 Tagen in Kultur lagen die Mikroglia oben auf der neuronalen Mischkultur auf (siehe Abb. 5.9). Erkennbar waren die Mikroglia durch ihre starke Lichtbrechung und Verzweigungen (siehe Abb. 5.9 schwarze Pfeile). Die locker aufliegende Mikroglia wurde abgeschlagen, eine definierte Zellzahl ausgeteilt und später immunzytochemisch auf ihre Reinheit hin kontrolliert. Mit einer Reinheit von ca. 95 % waren hauptsächlich Mikroglia vorhanden und nur vereinzelt GFAP positive Zellen (siehe Abb. 5.10). Durch die Färbung anderer Zellmarker konnten keine weiteren Zelltypen detektiert werden (nicht gezeigt). Es wurde bereits gezeigt, dass ASA von Mikroglia endozytiert wird (vergleiche Kap. 5.2.1). Auch, dass dies über einen MPR-unabhängigen Weg geschieht. Welche Rezeptoren dafür verantwortlich sind, wurde im Folgenden genauer untersucht. Dazu wurden primäre Mikroglia aus WT- und ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen mit 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  rhASA und verschiedenen Inhibitoren  $\mu\text{N}$  gefüttert (siehe Kap. 4.3.7). Abbildung 5.11 zeigt die aufgenommene Menge von rhASA, bezogen auf die Menge Gesamtprotein nach Zugabe der verschiedenen Inhibitoren in Mikroglia aus WT- und ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen. Die Werte der einzelnen, unabhängig durchgeführten Versuche ( $n = 2$  für jeweils WT und ASA<sup>-/-</sup>) waren sehr variabel (ca.  $\pm 0,4 \text{ ng}/\mu\text{g}$  für die Endozytose von Mikroglia mit rhASA und G6P). Ohne Kompetition bzw. mit G6P nahmen Mikroglia etwa 1,8 ng rhASA pro  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein auf. Die Kompetition des MPR300 durch M6P hatte wenig bis gar keinen Einfluss auf die Endozytose von rhASA in Mikroglia. Durch M6P wurde die Endozytose nur um maximal 50 % vermindert, wobei der Grad der Reduktion stark schwankte (0-40 %). Mannan, Mannose und Dextran-Sulfat hemmten die Endozytose jeweils um 30-60 %. Erst die Kombination von allen Inhibitoren sorgte für eine nahezu komplette Inhibition der rhASA Endozytose von etwa 97 %. Diese Inhibition der Endozytose konnte



**Abbildung 5.9: Murine, neuronale Mischkultur mit aufsitzenden Mikroglia.**

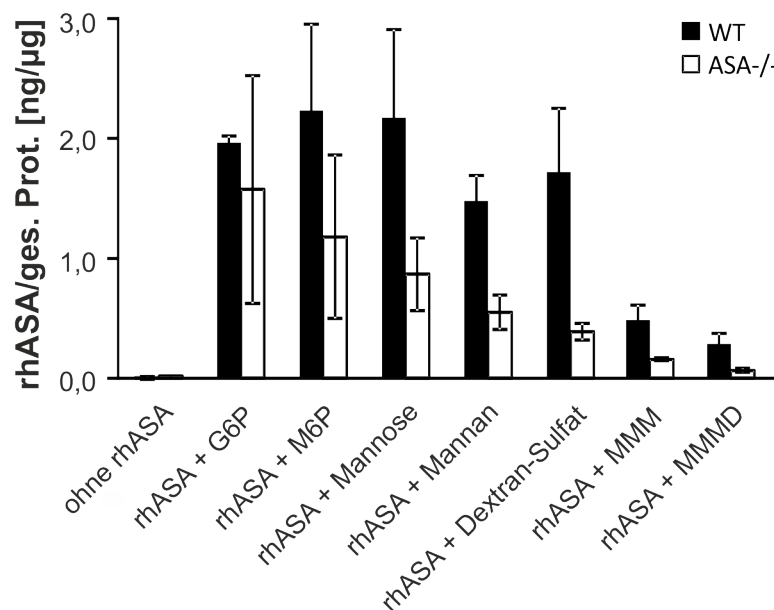
Durchlicht Aufnahme einer neuronalen Mischkultur aus WT-Mäusen. Bei den stark lichtbrechenden, leicht verzweigten Zellen handelt es sich um Mikroglia (schwarze Pfeile), welche einem Monolayer aus Fibroblasten, Astrozyten und vereinzelt Neuronen und Oligodendrozyten auflagen. Die locker aufsitzenden Mikroglia lösten sich, durch Klopfen gegen die Zellkulturflasche ab und waren anschließend im Kultivierungsmedium. Der Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

in unabhängigen Experimenten ( $\pm 2\%$ ) reproduziert werden. Unter Verwendung der gleichen Inhibitoren konnte dieses Experiment in BV2-Zellen mit ähnlichen Ergebnissen reproduziert werden (nicht gezeigt). Zum Nachweis, dass die verwendeten Inhibitoren (außer M6P) keinen Einfluss auf die Endozytosefähigkeit anderer Zellen haben, wurden 17-/ A1-Astrozyten mit rhASA unter Zugabe der Inhibitoren mit rhASA gefüttert (siehe Kap. 5.2.3)



**Abbildung 5.10: Immunzytochemische Färbung zur Ermittlung der Reinheit von Mikroglia.**

Die Reinheit der Mikroglia wurde durch die Färbung von F4/80 und GFAP überprüft. Astrozyten (rot) wurden mit einem Antikörper, der gegen GFAP gerichtet ist und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-Alexa Fluor 546 detektiert. Mikroglia (grün) wurden mit einem Antikörper, der gegen F4/80 gerichtet ist und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Ratte-DyLight 488 detektiert. A: Areal mit nur F4/80 positiven Mikroglia B: Areal mit F4/80 positiven Mikroglia und zwei GFAP positiven Astrozyten C: Für die Kontrolle wurden nur die Sekundärantikörper verwendet. Der Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

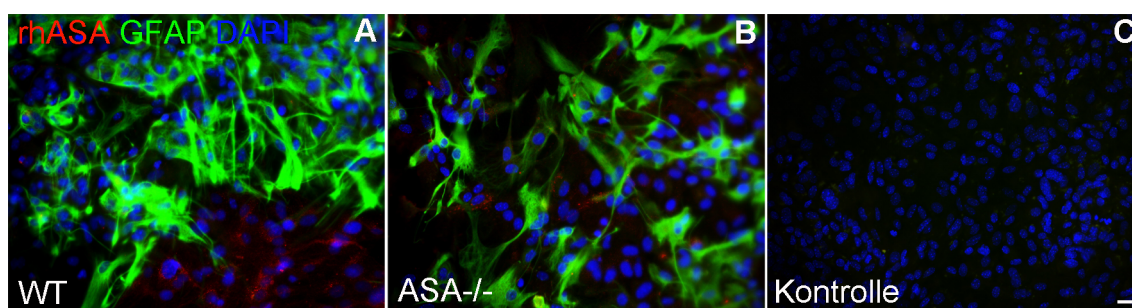


**Abbildung 5.11: Endozytose von rhASA in primäre Mikroglia aus WT- und ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen.**

Primäre Mikroglia aus WT- (schwarze Balken) und ASA<sup>-/-</sup> (weiße Balken) Mäusen wurden  $\text{in vitro}$  mit 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  rhASA unter Zugabe von 7,5 mM G6P/M6P/D-(+)-Mannose, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Dextran-Sulfat oder 0,1 mg/ml Mannan gefüttert. Nach Entfernung oberflächengebundener ASA durch Waschen mit einem aziden Puffer wurde die intrazelluläre ASA-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Die Aufnahme ist als ng rhASA pro  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 2$ ).

### 5.2.3 Endozytose von rhASA in Astrozyten

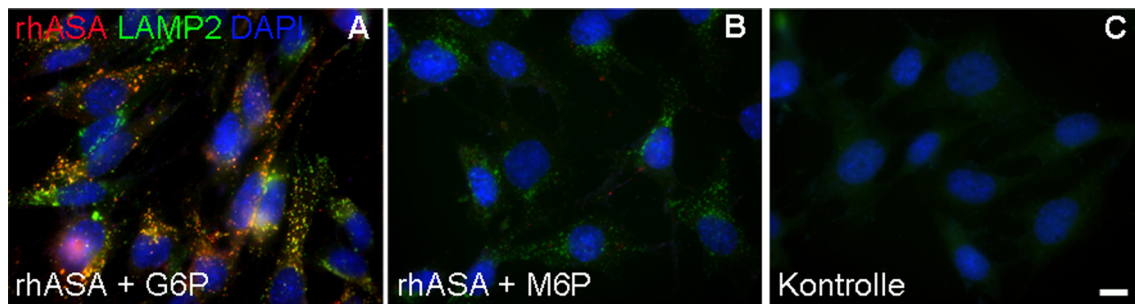
Zur Ermittlung der Endozytosefähigkeit von Astrozyten wurden diese, wie in Kapitel 4.3.6.3 beschrieben, gewonnen und  $\ddot{u}N$  mit  $5\text{ }\mu\text{g/ml}$  rhASA, unter Zugabe von  $7,5\text{ mM}$  G6P/M6P, gefüttert. Zunächst wurde die Reinheit und gleichzeitig die Aufnahme von rhASA mittels Immunzytochemie, mit GFAP als Marker für Astrozyten, überprüft. Wie in Abbildung 5.12 zu sehen ist, befanden sich neben GFAP positive Zellen auch nicht GFAP positive Zellen in der Kultur. Der Anteil an GFAP positiven Zellen betrug dabei etwa 50 %. Zusätzlich fiel auf, dass überwiegend nur Zellen rhASA endozytierten, die nicht GFAP positiv waren. Ein Unterschied zwischen Astrozyten aus WT-Mäusen oder  $ASA^{-/-}$ -Mäusen konnte dabei nicht festgestellt werden. Um welche Zellen es sich bei den nicht GFAP positiven Zellen handelte konnte nicht gezeigt werden. Aufgrund der hohen Kontaminationsrate mit anderen Zelltypen, wurde kein ELISA zur Bestim-



**Abbildung 5.12: Immunzytochemie von primären Astrozyten.**

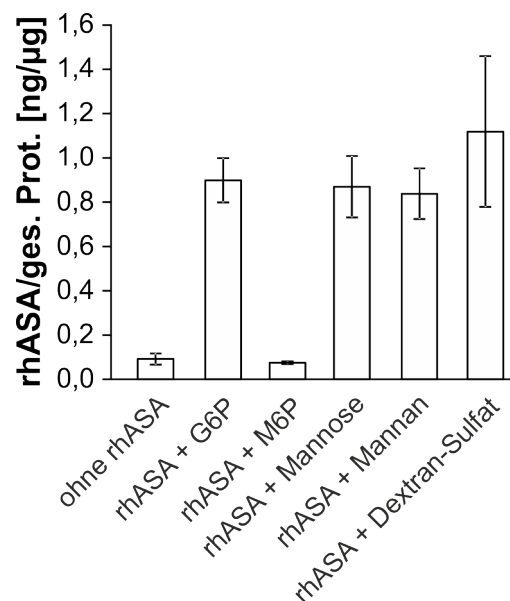
Primäre Astrozyten aus WT- bzw.  $ASA^{-/-}$ -Mäusen wurden  $\ddot{u}N$  mit  $5\text{ }\mu\text{g/ml}$  rhASA gefüttert. Es wurde sowohl GFAP als Astrozytenmarker, als auch rhASA immunzytochemisch gefärbt. Zur Detektion von rhASA (rot) wurde der affinitätsgereinigte, polyklonale Kaninchen-anti-hASA Antikörper (PFA-affi) und der Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 benutzt. Astrozyten (grün) wurden mit einem Antikörper, der gegen GFAP gerichtet ist und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-Alexa Fluor 488 detektiert. A: Färbung von Astrozyten aus WT-Mäusen. B: Färbung von Astrozyten aus  $ASA^{-/-}$ -Mäusen. C: Für die Kontrolle wurden nur die Sekundärantikörper verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht  $20\text{ }\mu\text{m}$ .

mung der Konzentration endozytierter rhASA an primären Astrozyten durchgeführt. Stattdessen wurde dieser an immortalisierten Astrozyten einer ASA-defizienten-Maus (17-/- A1-Zellen, siehe Tab. 3.4) durchgeführt. Die Immunfärbung der gefütterten Zellen zeigte eine lysosomale Sortierung der endozytierten rhASA (siehe Abb. 5.13 A). Nach zusätzlicher Inkubation von M6P konnte keine rhASA mehr nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.13 B). Mittels ELISA (siehe Abb. 5.14) konnte eine Aufnahme von  $0,9\text{ ng je }\mu\text{g}$  Gesamtproteingehalt ermittelt werden. Die Aufnahme ließ sich durch Kompetition mit M6P nahezu komplett inhibieren (zu ca. 91 %), was auf eine MPR300-abhängige Endozytose hindeutet. Andere zugefügte Substanzen, wie z.B. Dextran-Sulfat, hatten keinen Einfluss auf die Endozytosefähigkeit von 17-/- A1-Zellen.



**Abbildung 5.13: Immunzytochemie von 17-/- A1-Zellen.**

Die ASA-defiziente Astrozyten Zelllinie 17-/- A1 wurde mit  $5 \mu\text{g/ml}$  rhASA unter Zugabe von  $7,5 \text{ mM}$  G6P/M6P gefüttert. Es wurde sowohl rhASA (rot) als auch das lysosomal, endosomale Protein LAMP2 (grün) immunzytochemisch gefärbt. Zur Detektion von rhASA (rot) wurde der affinitätsgereinigte, polyklonale Kaninchen-anti-hASA Antikörper (PFA-affi) und der Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 benutzt. Lysosomen (grün) wurden mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen das lysosomale, endosomale Protein LAMP2 gerichtet ist (Abl-93) und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Ratte-DyLight 488 detektiert. A: Inkubation mit rhASA und gleichzeitiger Zugabe von G6P. Ko-Färbung von rhASA und LAMP2. B: Inkubation mit rhASA und gleichzeitiger Zugabe von M6P. Ko-Färbung von rhASA und LAMP2. C: Für die Kontrolle wurden nur die Sekundärantikörper verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht  $10 \mu\text{m}$ .



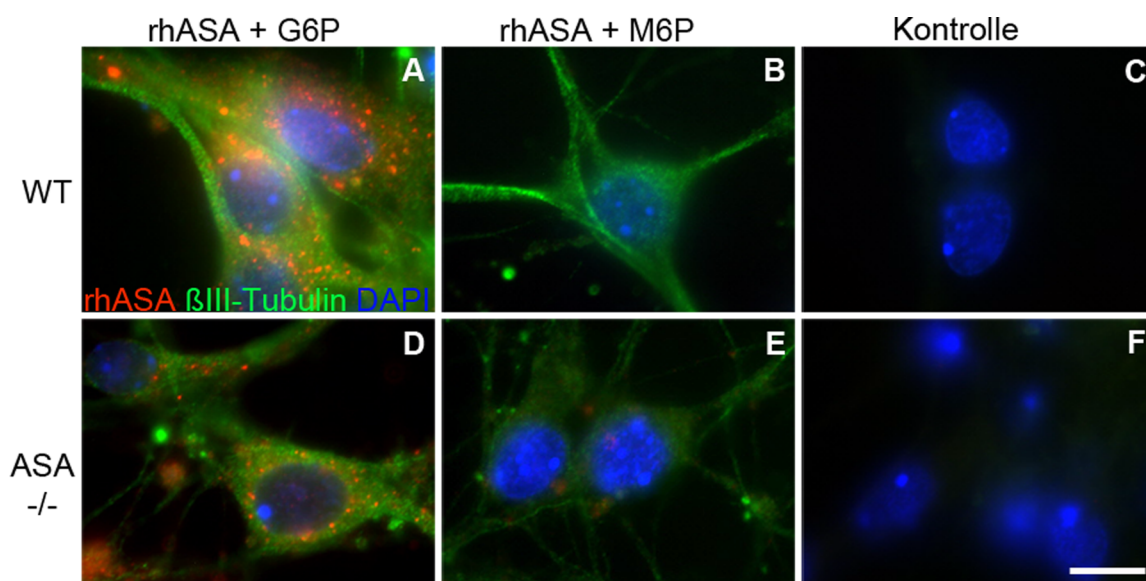
**Abbildung 5.14: Endozytose von rhASA in 17-/- A1-Zellen.**

ASA-defiziente 17-/- A1-Zellen (siehe Tab. 3.4) wurden  $5 \mu\text{g/ml}$  rhASA, unter Zugabe von  $7,5 \text{ mM}$  G6P/M6P/D-(+)-Mannose,  $50 \mu\text{g/ml}$  Dextran-Sulfat oder  $0,1 \text{ mg/ml}$  Mannan gefüttert. Nach Entfernung oberflächengebundener rhASA durch Waschen mit einem aziden Puffer wurde die intrazelluläre ASA-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Die Aufnahme ist als  $\text{ng rhASA pro } \mu\text{g Gesamtprotein}$  gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 3$ ).



### 5.2.4 Endozytose von rhASA in primäre Neurone

Neurone wurden, wie in Kapitel 4.3.6.5 beschrieben, aus dem Hippocampus von einem Tag alten Mäusen gewonnen. Nach fünf Tagen in Kultur wurden diese mit 5  $\mu\text{g/ml}$  rhASA unter Zugabe von 7,5 mM G6P/M6P gefüttert, am sechsten Tag mit einem aziden Puffer gewaschen und fixiert bzw. homogenisiert. Bei Überprüfung der Reinheit mittels Ko-Immunfärbungen von  $\beta\text{III-Tubulin}$  mit spezifischen Zellmarkern konnten keine weiteren Zelltypen gefunden werden (nicht gezeigt). Abbildung 5.15 zeigt die Immunzytochemie von gefütterten, primären Neuronen aus WT- und  $\text{ASA}^{-/-}$ -Mäusen, an denen  $\beta\text{III-Tubulin}$  und ASA detektiert wurde. Durch die Zugabe von M6P (siehe Abb. 5.15 B und E) konnte keine ASA in den Neuronen detektiert werden. Zur Ermittlung der intrazellulären ASA-Konzentration nach Endozytose und deren

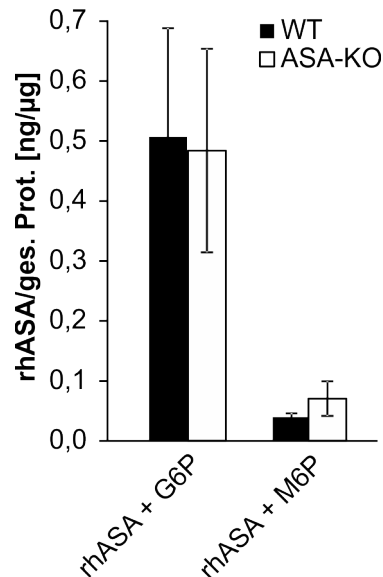


**Abbildung 5.15: Immunzytochemie von  $\beta\text{III-Tubulin}$  und ASA an gefütterten, primären Neuronen.**

Primäre Neurone aus WT- bzw.  $\text{ASA}^{-/-}$ -Mäusen wurden  $\text{in vitro}$  mit 5  $\mu\text{g/ml}$  rhASA unter Zugabe von 7,5 mM G6P/M6P gefüttert. Es wurde sowohl  $\beta\text{III-Tubulin}$  als Neuronen-Marker, als auch rhASA immunzytochemisch gefärbt. Zur Detektion von rhASA (rot) wurde der affinitätsgereinigte, polyklonale Kaninchen-anti-hASA Antikörper (PFA-affi) und der Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 benutzt. Neurone (grün) wurden mit einem Antikörper, der gegen  $\beta\text{III-Tubulin}$  gerichtet ist und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-Alexa Fluor 488 detektiert. A-C primäre WT-Neurone. D-F: Primäre  $\text{ASA}^{-/-}$ -Neurone. A und D: Fütterung mit rhASA und G6P. B und E: Fütterung mit rhASA und M6P. C und F: Für die Kontrolle wurden nur die Sekundärantikörper verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

MPR300 abhängige Aufnahme in Neurone wurde ein ELISA der Zellhomogenate durchgeführt. In Abbildung 5.16 ist ein Vergleich von Neuronen aus WT- (schwarze Balken) und  $\text{ASA}^{-/-}$ - (weiße Balken) Mäusen gezeigt. Das Diagramm zeigt die aufgenommenen ng ASA, bezogen auf den Gesamtproteingehalt des Zellhomogenats. Sowohl Neurone aus WT- als auch Neurone aus  $\text{ASA}^{-/-}$ -Mäusen nahmen etwa 0,5 ng rhASA pro  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein auf. Diese Aufnahme

wurde Größtenteils (zu ca. 98 %) durch die Zugabe von M6P, dem kompetitiven Inhibitor von MPR300, inhibiert. Zwischen Neuronen aus WT- und ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen ließ sich kein Unterschied feststellen.



**Abbildung 5.16:** Aufnahme von rhASA in primäre Neurone aus WT- und ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen.

Primäre Neurone aus WT- (schwarze Balken) und ASA<sup>-/-</sup>- (weiße Balken) Mäusen wurden üN mit 5 μg/ml rhASA, unter Zugabe von 7,5 mM G6P/M6P, gefüttert. Nach Entfernung oberflächengebundener rhASA durch Waschen mit einem aziden Puffer wurde die intrazelluläre ASA-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Die Aufnahme ist als ng rhASA pro μg Gesamtprotein gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichungen (n = 3).

### 5.2.5 Endozytose von rhASA in primäre Oligodendrozyten-Vorläuferzellen

Wie in Kapitel 4.3.6.4 beschrieben, wurden OVZ aus Neurosphären gewonnen. An Tag neun in Kultur wurden die mit Forskolin behandelten OVZ fixiert und zunächst mittels Immunzytochemie auf ihre Reinheit hin getestet. Dazu wurde der OVZ-Marker NG2 und der Astrozyten-Marker GFAP gefärbt. Abbildung 5.17 C und I zeigt die Überlagerung der NG2 (rot) und GFAP (grün) Färbung zusammen mit DAPI in einer Kultur von OVZ aus WT- und ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen. Diese bestand bei beiden Genotypen größtenteils aus NG2 positiven OVZ. Die leichte Färbung für GFAP in B und H ist auf Autofluoreszenz zurückzuführen, wie in der Sekundärantikörperkontrolle für GFAP (E und K) zu erkennen ist.

## Oligodendrozyten-Vorläuferzellen WT

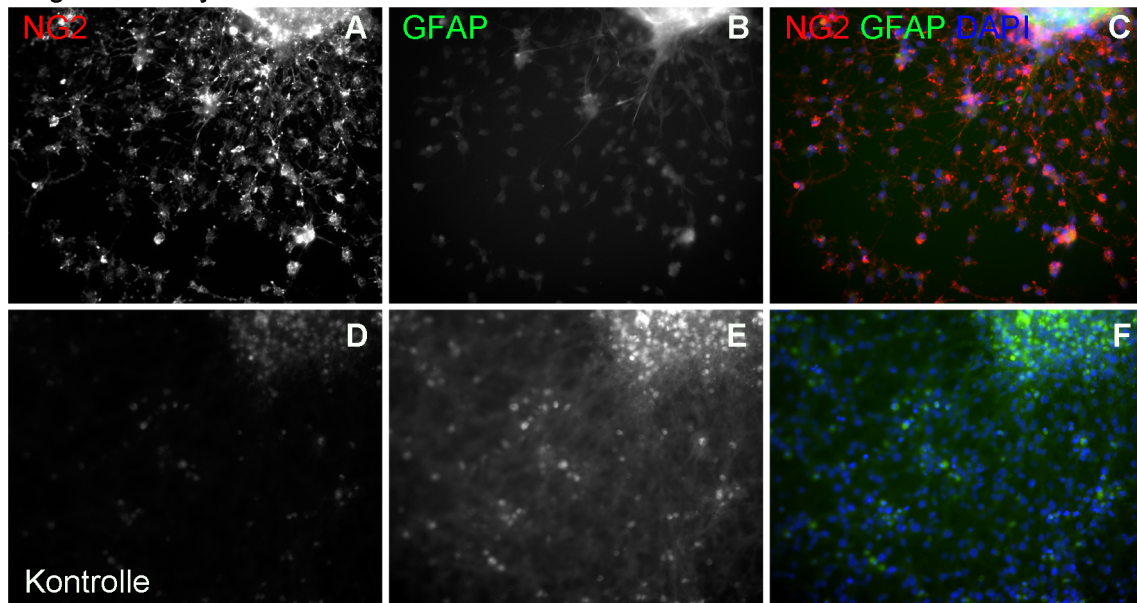
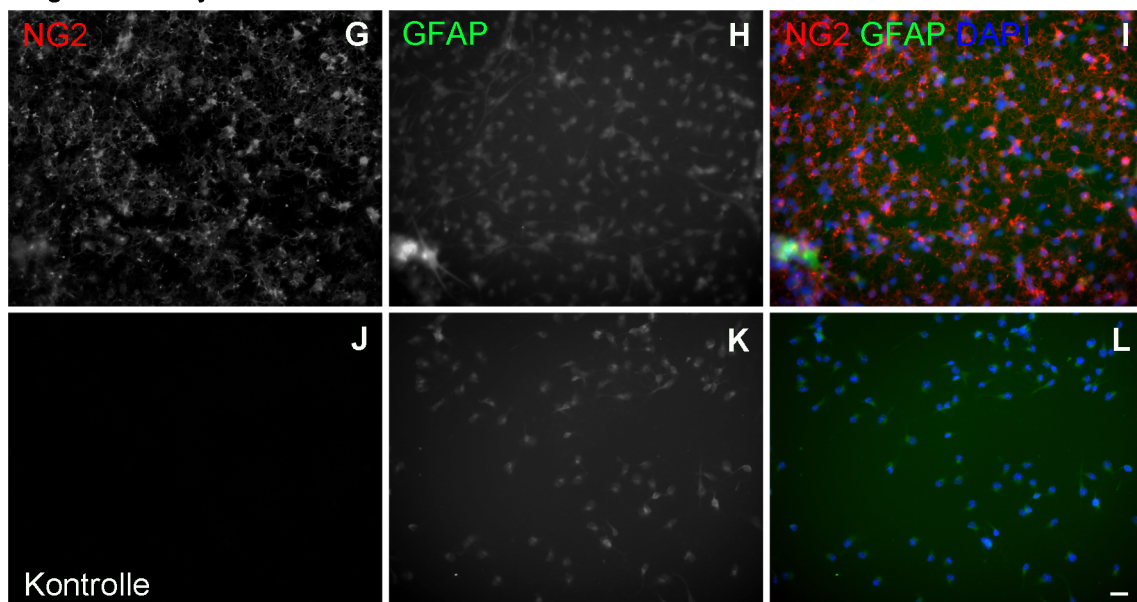
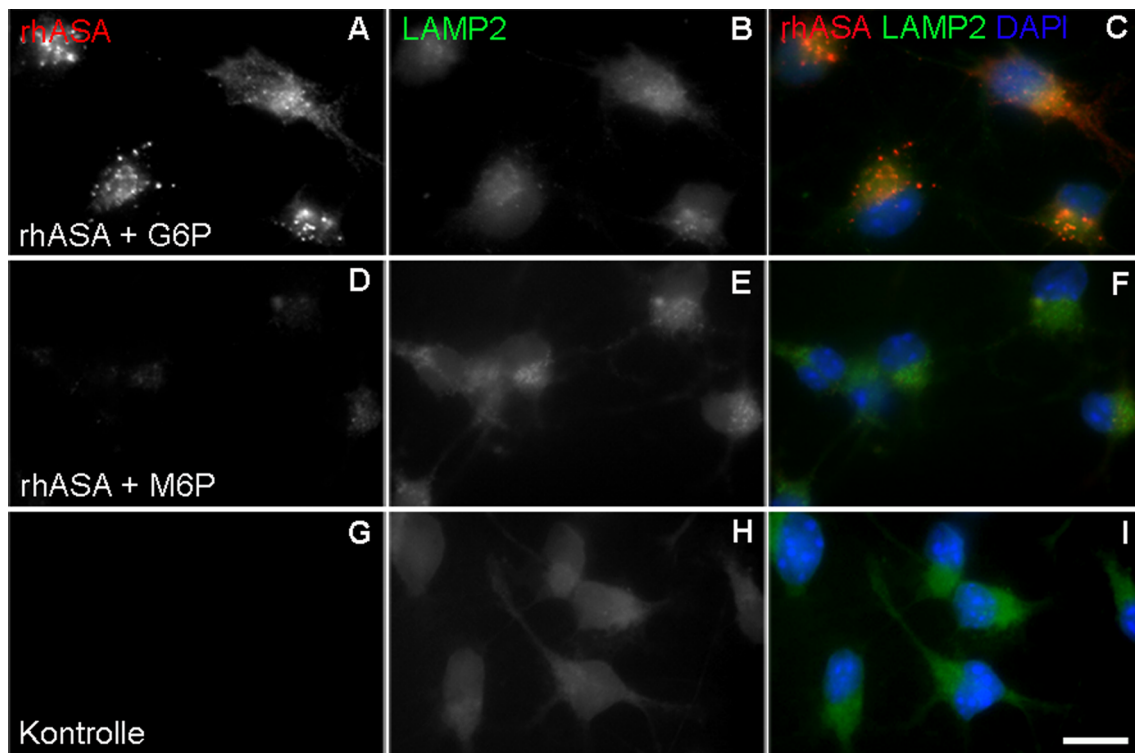
Oligodendrozyten-Vorläuferzellen ASA<sup>-/-</sup>

Abbildung 5.17: NG2- und GFAP-Färbung von OVZ.

An primären OVZ aus WT- (A-F) und ASA<sup>-/-</sup> (G-L) Mäusen wurden NG2 und GFAP immunzytochemisch gefärbt. Zur Detektion von OVZ (rot) wurde der Kaninchen-anti-NG2 Antikörper und der Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 benutzt. Astrozyten (grün) wurden mit einem Antikörper, der gegen GFAP gerichtet ist und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-Alexa Fluor 488 detektiert. A-C: Ko-Färbung von NG2 und GFAP an OVZ aus WT-Mäusen. A: Färbung von NG2. B: Färbung von GFAP. C: Überlagerung von GFAP und NG2. D-F: Für die Kontrolle wurden nur die Sekundärantikörper verwendet. D: Sekundärantikörperkontrolle für NG2. E: Sekundärantikörperkontrolle für GFAP. F: Überlagerung beider Kanäle. G-I: Ko-Färbung von NG2 und GFAP an OVZ aus ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen. G: Färbung von NG2. H: Färbung von GFAP. I: Überlagerung von GFAP und NG2. J-L: Für die Kontrolle wurden nur die Sekundärantikörper verwendet. J: Sekundärantikörperkontrolle für NG2. K: Sekundärantikörperkontrolle für GFAP. L: Überlagerung beider Kanäle. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu$ m.

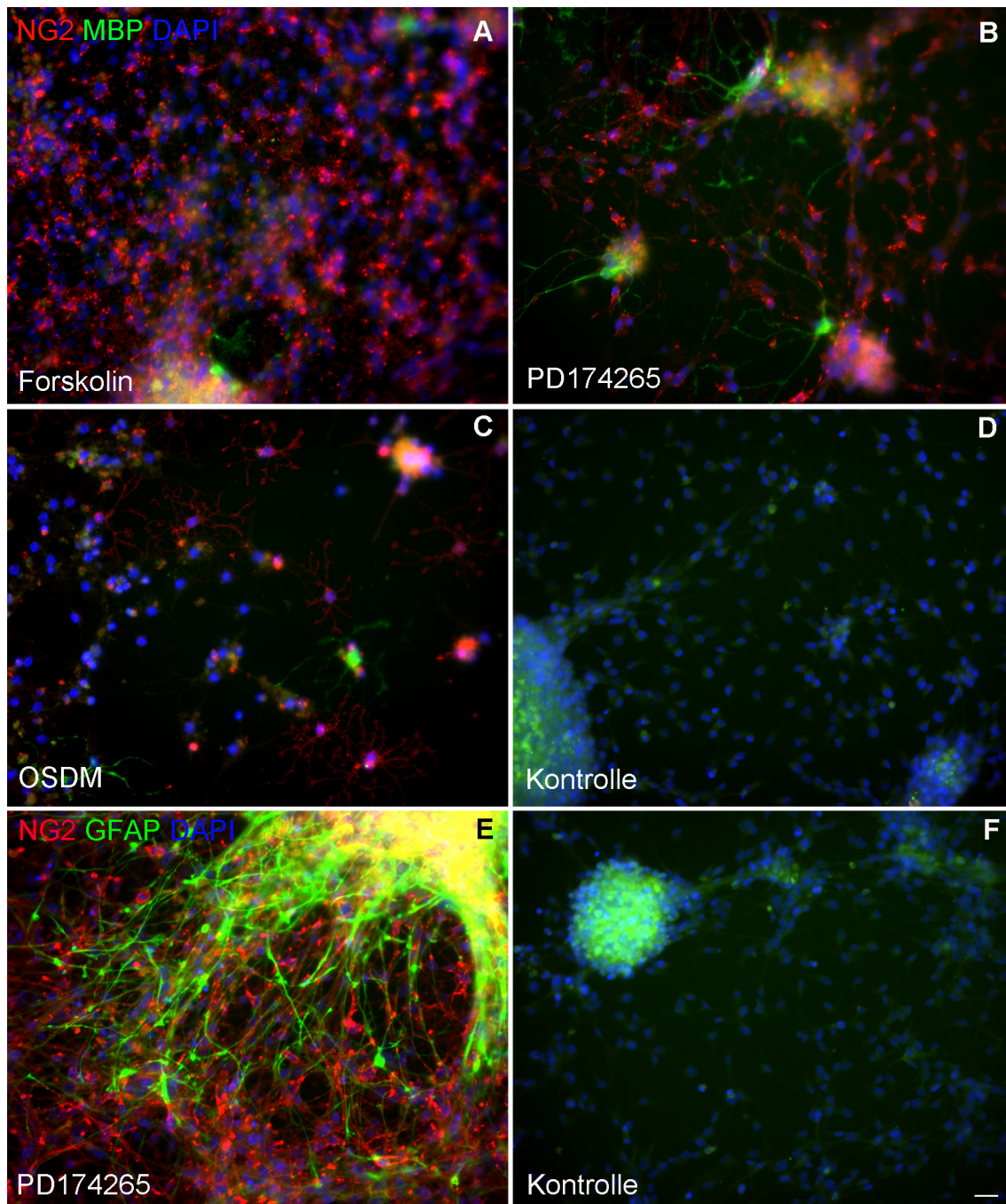
Weiterhin wurde die Endozytose von rhASA und deren MPR300-Abhängigkeit immunzytochemisch überprüft. In Abbildung 5.18 ist exemplarisch die rhASA Endozytose und deren MPR300-Abhängigkeit an OVZ aus WT-Mäusen dargestellt. Die Färbung der endozytierten rhASA in Abbildung 5.18 zeigt deutlich eine Verringerung der ASA Endozytose bei Konkurrenz des MPR300 durch M6P (D-F) im Vergleich zur Fütterung von rhASA zusammen mit G6P (A-C).



**Abbildung 5.18: Immunzytochemische Färbung von gefütterten OVZ aus WT-Mäusen.** Primäre OVZ aus WT-Mäusen wurden  $\text{in vitro}$  mit  $5 \mu\text{g/ml}$  rhASA unter Zugabe von  $7,5 \text{ mM}$  G6P/M6P gefüttert. Es wurde sowohl rhASA als auch das lysosomale, endosomale Protein LAMP2 immunzytochemisch gefärbt. Zur Detektion von rhASA (rot) wurde der affinitätsgereinigte, polyklonale Kaninchen-anti-hASA Antikörper (PFA-affi) und der Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 benutzt. Lysosomen (grün) wurden mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen das lysosomale, endosomale Protein LAMP2 gerichtet ist (Abl-93) und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Ratte-DyLight 488 detektiert. A-C: Fütterung von rhASA zusammen mit G6P. A: Endozytierte rhASA. B: LAMP2. C: Überlagerung von rhASA mit LAMP2. D-F: Fütterung von rhASA zusammen mit M6P. D: Endozytierte rhASA. E: LAMP2. F: Überlagerung von rhASA mit LAMP2. G-I: Für die Kontrolle wurden nur die Sekundärantikörper verwendet. G: Cy3-markierter Sekundärantikörper. H: Alexa Fluor 488-markierter Sekundärantikörper. I: Überlagerung beider Kanäle. Die Zellkerne wurden mit DAPI anfärbt. Der Maßstabsbalken entspricht  $10 \mu\text{m}$ .

Des Weiteren wurde versucht OVZ mittels PD174265 oder OSDM (siehe Kap. 4.3.6.4) zu MBP positiven Oligodendrozyten zu differenzieren.

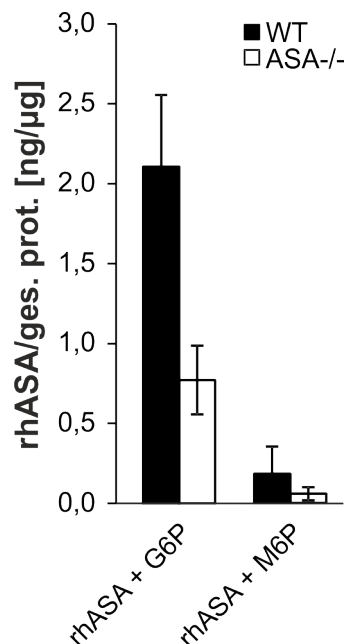




**Abbildung 5.19: Differenzierung von Oligodendrozyten-Vorläuferzellen.**

Differenzierung von OVZ in Oligodendrozyten mittels PD174265 bzw. OSDM für vier Tage und immunzytochemische Färbung von OVZ, Oligodendrozyten bzw. Astrozyten zur Kontrolle des Differenzierungserfolgs. Zur Detektion von OVZ (rot) wurde der Kaninchen-anti-NG2 Antikörper und der Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 benutzt. Oligodendrozyten (grün) wurden mit einem Antikörper, der gegen MBP gerichtet ist und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Ratte-DyLight 488 detektiert. Astrozyten (grün) wurden mit einem Antikörper, der gegen GFAP gerichtet ist und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-Alexa Fluor 488 detektiert. A: Färbung von NG2 und MBP von mit Forskolin kultivierten OVZ. B: Färbung von NG2 und MBP von PD174265 behandelten OVZ. C: Färbung von NG2 und MBP von in OSDM kultivierten OVZ. D: Für die Kontrolle wurden nur die Sekundärantikörper verwendet. E: Färbung von NG2 und GFAP von PD174265 behandelten OVZ. F: Für die Kontrolle wurden nur die Sekundärantikörper verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

Dazu wurden die OVZ für vier Tage unter Zugabe von PD174265 oder OSDM kultiviert. Die Differenzierung von OVZ mittels PD174265 führte zu einer teilweisen (ca. 10 %) Differenzierung der OVZ zu MBP positiven Oligodendrozyten (siehe Abb. 5.19 B, grün). Allerdings war die Kultur von PD174265 behandelten OVZ reich an GFAP positiven Zellen (ca. 50 %), wie in Abbildung 5.19 E (grün) zu erkennen ist. Es handelte sich also nach Behandlung der OVZ mit PD174265 nicht mehr um eine Reinkultur, sondern um eine Mischkultur aus NG2 positiven, MBP positiven und GFAP positiven Zellen. Eine Kultivierung der OVZ mit OSDM (siehe Abb. 5.19 C) führte zu einer starken morphologischen Veränderung der Zellen, welche nicht alle MBP positiv waren. Allerdings starben viele Zellen ab. Bei mit OSDM behandelten OVZ konnten, aufgrund limitierter Zellzahl, keine Zellen für eine GFAP Färbung ausgesät werden. Zur Bestimmung der absoluten rhASA Aufnahme in OVZ wurden diese mit  $5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  rhASA und 7,5 mM G6P/M6P gefüttert und ein ELISA der Zellhomogenate durchgeführt. In Abbildung 5.20 ist die Menge endozytierter rhASA pro Gesamtprotein in  $\text{ng}/\mu\text{g}$  aufgetragen. OVZ aus WT-Mäusen nahmen dabei etwa  $2 \text{ ng}/\mu\text{g}$  auf, wohingegen OVZ aus  $\text{ASA}^{-/-}$ -Mäusen nur ca.  $0,8 \text{ ng}/\mu\text{g}$  aufnahmen. Durch die Zugabe von 7,5 mM M6P wurde die Endozytose sowohl bei WT- als auch bei  $\text{ASA}^{-/-}$ -OVZ zu ca. 92 % gehemmt.

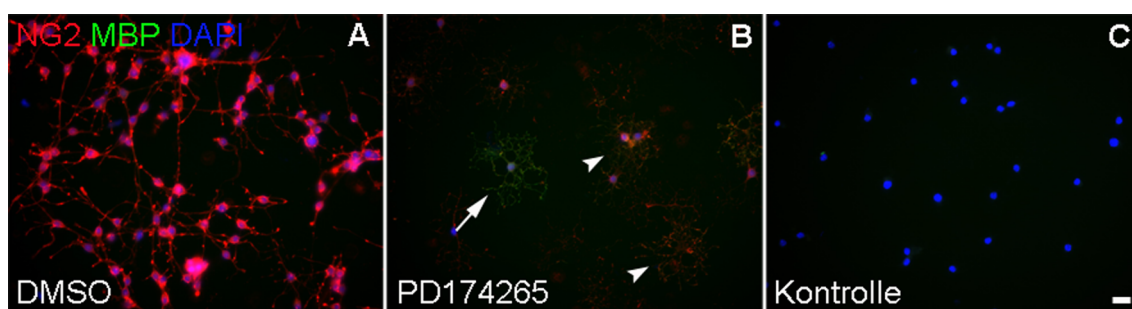


**Abbildung 5.20: Endozytose in primäre OVZ aus WT- und  $\text{ASA}^{-/-}$ -Mäusen.**

Primäre OVZ aus WT- (schwarze Balken) und  $\text{ASA}^{-/-}$ - (weiße Balken) Mäusen wurden  $\text{in vitro}$  mit  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$  rhASA, unter Zugabe von 7,5 mM G6P/M6P, gefüttert. Nach Entfernung oberflächengebundener ASA durch Waschen mit einem aziden Puffer wurde die intrazelluläre ASA-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Die Aufnahme ist als  $\text{ng rhASA pro } \mu\text{g Gesamtprotein}$  gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 3$ ).

### 5.2.6 Endozytose von rhASA in differenzierte und undifferenzierte Oli-*neu*-Zellen

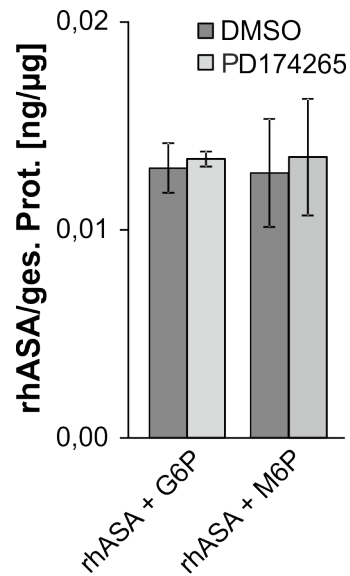
Da primäre OVZ nicht in Oligodendrozyten differenziert werden konnten, (siehe Abb. 5.19), wurde die OVZ-Zelllinie Oli-*neu* [52] mittels PD174265 (siehe Kap. 4.3.6.4) in MBP exprimierende Oligodendrozyten differenziert. Abbildung 5.21 zeigt die erfolgreiche Differenzierung der Oli-*neu*-Zellen durch PD174265 nach drei Tagen in Kultur. Undifferenzierte Oli-*neu*-Zellen waren ausschließlich NG2 (rot) positiv und bipolar. Nach Behandlung zeigten sich viele Verzweigungen bei allen Zellen und eine starke (siehe Abb. 5.21 B Pfeil) bis schwache (siehe Abb. 5.21 B Pfeilköpfe) MBP Färbung. Die Intensität der NG2-Färbung war nach Differenzierung (siehe Abb. 5.21 B) schwächer als vor Differenzierung (siehe Abb. 5.21 A), was auf einen Rückgang der NG2 Expression hinweist. Anschließend wurde sowohl in undifferenzierten (sie-



**Abbildung 5.21: Differenzierung von Oli-*neu*-Zellen.**

Differenzierung von Oli-*neu*-Zellen in Oligodendrozyten mittels PD174265 und immunzytochemische Färbung von NG2 und MBP zum Nachweis einer erfolgreichen Differenzierung. Zur Detektion von undifferenzierten Oli-*neu*-Zellen wurde der Kaninchen-anti-NG2 Antikörper (rot) und der Sekundärantikörper Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 benutzt. Differenzierte Oligodendrozyten wurden mit einem Antikörper, der gegen MBP (grün) gerichtet ist und dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Ratte-DyLight 488 detektiert. A: Färbung von NG2 und MBP von unbehandelten Oli-*neu*-Zellen. B: Färbung von NG2 und MBP von PD174265 behandelten Oli-*neu*-Zellen. Der Pfeil kennzeichnet eine Zelle mit starker MBP Expression, Pfeilköpfe kennzeichnen Zellen mit schwacher MBP Expression. C: Für die Kontrolle wurden nur die Sekundärantikörper verwendet. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu\text{m}$ .

he Abb. 5.22 dunkelgraue Balken) als auch in differenzierten (siehe Abb. 5.22 hellgraue Balken) Oli-*neu*-Zellen die rhASA Endozytose und deren MPR300-Abhängigkeit mittels ELISA überprüft. Sowohl undifferenzierte als auch differenzierte Oli-*neu*-Zellen nahmen dabei etwa 0,01 ng/ $\mu\text{g}$  auf. Durch die Zugabe von 7,5 mM M6P wurde die Endozytose nicht gehemmt. In ungefütterten Oli-*neu*-Zellen konnte keine rhASA nachgewiesen werden (nicht gezeigt).



**Abbildung 5.22: Endozytose in undifferenzierte und differenzierte Oli-*neu*-Zellen.**

Undifferenzierte (dunkelgraue Balken) und differenzierte (hellgraue Balken) Oli-*neu*-Zellen wurden  $5 \mu\text{g/ml}$  rhASA, unter Zugabe von  $7,5 \text{ mM}$  G6P/M6P, gefüttert. Nach Entfernung oberflächengebundener ASA durch Waschen mit einem aziden Puffer wurde die intrazelluläre ASA-Konzentration mittels ELISA bestimmt. Die Aufnahme ist als ng rhASA pro  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen ( $n = 3$ ).



# 6 Diskussion

## 6.1 Intrazerebroventrikuläre Enzyersatztherapie mittels osmotischer Minipumpen

Die lysosomale Hydrolase Arylsulfatase A (ASA) katalysiert den ersten Schritt der Degradation des Glykosphingolipids Sulfatid. Ein Defekt der ASA verhindert den Abbau von Sulfatid, welches daraufhin lysosomal akkumuliert. Dies führt zu der lysosomalen Speicherkrankheit (LSD) metachromatische Leukodystrophie (MLD), deren Kennzeichen eine Anreicherung von Sulfatid im Nervensystem und eine fortschreitende Demyelinisierung sind. Dadurch kommt es zu schwerwiegenden neurologischen Symptomen und letztendlich zum Tod.

Es bestehen verschiedene Therapieansätze zur Behandlung der MLD (siehe Kap. 2.7). Bei der Enzyersatztherapie (EET) wird dem Patienten lebenslang rekombinant hergestelltes Enzym injiziert. Nach ihrer Endozytose werden die meisten lysosomalen Enzyme aufgrund einer Markierung mit Mannose-6-Phosphat (M6P) in die Lysosomen transportiert. Da die Blut-Hirn-Schranke (BHS) den Transport des rekombinanten Enzyms in das Gehirn verhindert, ist die EET bei LSDs mit Beteiligung des ZNS nicht effizient. Die Überwindung der BHS ist daher ein wichtiges Ziel für eine erfolgreiche Therapie. Dazu gehört u.a. die Knochenmarkstransplantation (KMT) allogener oder genetisch veränderter, autologer hämatopoetischer Stammzellen, die dem Organismus das intakte Enzym zur Verfügung stellen. Hierbei werden vom Knochenmark stammende Zellen, deren Abkömmlinge über die BHS in das ZNS migrieren können, in das Knochenmark des Patienten transplantiert [76]. Im Gehirn soll das von diesen Zellen sezernierte Enzym von den residenten Gehirnzellen aufgenommen und lysosomal transportiert werden. Wie schon in Kapitel 2.7 erwähnt wurde mit dieser Therapie nur eine Verzögerung der Symptome erzielt und keine Heilung [84], [54], [113]. Es wird also eine andere Art der Therapie benötigt.

Zur Umgehung der BHS kann das Enzym direkt in das ZNS, entweder durch intrathekale Injektion in den Subarachnoidalraum (Raum zwischen den beiden Hirnhäuten der Arachnoidea und der Pia mater) oder durch intrazerebroventrikuläre (i.z.v.) Injektion, appliziert werden. Durch Ultrafiltration des Blutes, im Plexus choroideus der Seitenventrikel, gebildete Zerebrospinalflüssigkeit fließt durch das Foramen Monroi in den dritten Ventrikel. Ein weiterer Plexus choroideus befindet sich im unteren Bereich des vierten Ventrikels. Die innerhalb der Ventrikel produzierte Zerebrospinalflüssigkeit wird nicht vollständig über die innere Oberfläche der

Ventrikel ins Gehirngewebe zurück resorbiert. Deshalb entsteht ein gewisser Nettofluss der Zerebrospinalflüssigkeit aus den Seitenventrikeln über den dritten Ventrikel in den vierten Ventrikel und von dort in den äußeren Liquorraum, den Subarachnoidalraum. Die Rückresorption in das venöse Blut dieser austretenden Zerebrospinalflüssigkeit findet dann aus dem Subarachnoidalraum durch die Arachnoidalzotten (Ausstülpungen der Arachnoidea) oder die Wurzeltaschen der Spinalnerven (Austrittsstelle der Nerven des PNS aus dem Rückenmark) statt [101]. Bei der intrathekalen Injektion wird das Enzym demnach vom Gehirn abfließend injiziert. Mittels i.z.v. EET wird das Enzym direkt in den Ventrikel appliziert, weshalb die i.z.v. EET im Verlauf dieser Arbeit durchgeführt wurde.

Zum besseren Verständnis der MLD wurden verschiedene MLD-Mausmodelle erzeugt [46], [99]. ASA-knockout-Mäuse ( $ASA^{-/-}$ ) stellen aufgrund fehlender Demyelinisierung frühe Stadien bzw. die mildere, adulte Form der MLD dar [46], [128]. Zur Verstärkung des Phänotyps wurden transgene  $ASA^{-/-}$ -Mäuse erzeugt, die das Sulfatid-synthetisierende Enzym Cerebrosidsulfotransferase (CST) unter Kontrolle des Proteolipid-Protein (PLP)-Promotors, in myelinisierenden Oligodendrozyten und Schwannzellen überexprimieren [99] ( $ASA^{-/-}$  CST-PLP-Mäuse). Als zusätzliches Transgen wurde eine inaktive Form der humanen ASA in beide Modelle eingebracht. Wodurch eine Immuntoleranz der Mäuse gegenüber der rekombinanten humanen ASA (rhASA) ermöglicht wurde.

In einer vorangegangenen Studie, in denen 4 oder 50 mg/kg rhASA, verteilt auf 26 Injektionen zwei mal wöchentlich, intravenös appliziert wurde, konnte eine Abnahme der Sulfatidspeicherung um etwa 70 % schon bei 4 mg/kg rhASA erreicht werden. Dies wurde aber nur in peripheren Organen und dem PNS erreicht. Die, intravenöse Injektion hoher Konzentrationen der rhASA von 50 mg/kg führte allerdings zu einem Übertritt der applizierten ASA in das Gehirn und zu einer Sulfatidabnahme im Gehirn von 45 %. Als Folge wurde eine Verbesserung der motorischen Fähigkeiten, wie der Schrittlänge erreicht. Allerdings wurden nicht alle veränderten Schrittparameter der MLD-Mäuse korrigiert. Dosen von 20-50 mg/kg reduzieren die Lipidspeicherung im Gehirn und Rückenmark aber verhindern diese nicht. Die erforderliche Dosis von rhASA um bessere ZNS Effekte zu erzielen wird demnach höher liegen [78]. Eine Therapie von Patienten wäre aufgrund der hohen Enzymmenge sehr kostspielig und daher nicht umsetzbar. Das Hauptproblem der intravenösen EET für die Behandlung von MLD und anderen LSDs mit Beteiligung des ZNS stellt demnach der Übertritt des applizierten Enzyms über die BHS dar. Es sind eine Reihe von verschiedenen Ansätzen publiziert, die versuchen, dieses Problem zu umgehen. Experimente an Mukopolysaccharidose (MPS) I, II und III Mäusen, bei denen das rekombinante Enzym intrathekal, in den Subarachnoidalraum, appliziert wurde, zeigten eine breite Verteilung des Enzyms über das gesamte ZNS. Die akkumulierten Glykosaminoglykane wurden degradiert [28]. Eine ähnliche Herangehensweise bietet die i.z.v. EET. Das Enzym wird direkt in den lateralen Ventrikel appliziert und somit eine Verteilung durch die Zerebrospinalflüssigkeit über das gesamte ZNS gewährleistet. Ausgehend von einem Durchschnittsgewicht der Maus von 30 g entspräche die Dosis für eine intravenöse Injektionen zwei Mal pro Woche

für 26 Wochen lang von 50 mg/kg [78] etwa 78 mg rhASA pro Maus. In der vorliegenden Arbeit wurden nur 120  $\mu$ g rhASA pro Maus verwendet.

Verschiedene Faktoren spielen eine Rolle bei der Effizienz der i.z.v. EET. Dazu zählen: Die Nebenwirkungen der Prozedur; die Stabilität des Enzyms im Gehirn; seine Verteilung im Gewebe; die spezifische, zelluläre Aufnahme des applizierten Enzyms und die Abnahme des Speichermaterials. All diese Parameter wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Da im Alter von sechs Monaten bei ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen eine messbare Veränderung des Schrittmusters beginnt [118], wurden diese Tiere für die vorliegende Arbeit verwendet (siehe Tab. 4.1).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden, in Kooperation mit Stijn Stroobants (Labor für Biologische Psychologie, Katholische Universität Leuven, Belgien), osmotische Minipumpen für eine i.z.v. EET in Mäuse implantiert (siehe Abb. 4.1). Diese sorgten für eine kontinuierliche Abgabe von rekombinanter humaner ASA in den rechten lateralen Ventrikel. Zunächst wurde überprüft, ob die Abgabe der rhASA über den Zeitraum der Therapie von vier Wochen kontinuierlich war. Dazu wurde das im Pumpenreservoir verbliebene Restvolumen nach Entnahme der Pumpen bestimmt. Dabei fanden sich nur noch etwa 35 % des eingesetzten Ausgangsvolumens im Reservoir wieder. Von der Ursprünglichen spezifischen Aktivität konnten noch etwa 70 % nachgewiesen werden. Es kann also von einer kontinuierlichen Abgabe über die vier Wochen von 0,25  $\mu$ g aktiver rhASA pro Stunde ausgegangen werden (siehe Kap. 5.1.2).

Während des Injektionszeitraums konnten bei den Mäusen keine auf die Therapie zurückzuführenden Nebeneffekte festgestellt werden. Bei einer vierwöchigen, intravenösen EET von ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen, entwickelten die behandelten Mäuse einen letalen, anaphylaktischen Schock nach Injektion [77], [80]. In denselben Mäusen, sowie auch in dieser Arbeit verwendeten immuntoleranten Mäusen, konnten nach i.z.v. EET keinerlei Antikörper gegen die infundierte rhASA im Serum nachgewiesen werden (siehe Kap. 4.2.3.7). Aufgrund der inaktiven ASA bildeten immuntolerante Mäuse keine Antikörper gegen die applizierte rhASA. Da die BHS weitestgehend undurchlässig für im Blut befindliche Antikörper und Leukozyten ist, wirkt sie zudem als immunologische Barriere [103], was die fehlende Immunreaktion auf die applizierte rhASA bei immunkompetenten Mäusen erklärt. Ein ähnliches Ergebnis konnte in einer weiteren intraventrikulären EET Studie an Tripeptidylpeptidase I-knockout-Mausmodellen (TPP I-KO) zur spät infantilen, neuronalen Ceroid-Lipofuszinose (SINCL) erzielt werden. Chang und Kollegen nutzten 2008 ebenfalls osmotische Minipumpen zur Applikation rekombinanter TPP I in den lateralen Ventrikel. Auch hier wurden keine Antikörper gegen das infundierte Enzym im Serum detektiert [21].

Die in Kapitel 5.1.5 beschriebenen Ergebnisse zeigten eine breite Verteilung der rhASA im gesamten Gehirn. Mit größer werdendem Abstand zur Injektionsstelle nahm die Konzentration der rhASA ab. Die injizierte rhASA überquerte demnach die ependymale Zellschicht des Ventrikels und verteilte sich im Parenchym des Gehirns. Auch für andere LSDs mit zentralnervöser Beteiligung wurden Studien zur i.z.v. EET durchgeführt. Die Studie zur i.z.v. EET bei SINCL zeigte ebenfalls eine Verteilung der applizierten TPP I über das ganze Gehirn [21]. Bei der

Niemann-Pick Krankheit Typ A besteht ein Defekt der aziden Sphingomyelinase (ASM), was zu einer Anreicherung von Sphingomyelin, führt. Die Gruppe um Dodge zeigte 2009, dass eine kontinuierliche Injektion von ASM in den lateralen Ventrikel, von Mausmodellen der Niemann-Pick A Krankheit, eine bilaterale Verteilung des Enzyms über das gesamte Gehirn, bis hin zum zervikalen Rückenmark, führt. Dabei fand die Injektion lediglich über einen Zeitraum von sechs Stunden statt [32]. Die Verteilung der ASM zeigte in einer weiteren Studie an Ratten und nicht menschlichen Primaten ebenfalls eine abnehmende Konzentration bei größerem Abstand zur Injektionsstelle [132].

Auch für die Globoid Zell Leukodystrophie (GLD) wurde eine breite Verteilung im Gehirn der administrierten Galaktocerebrosidase mittels einer einzelnen Injektion in den lateralen Ventrikel erreicht [64]. Mittels i.z.v. EET konnte auch in Mukopolysaccharidose II (MPS II) Mäusen eine Anreicherung der Iduronat-2-Sulfatase (I2S) im Gehirn erzielt werden [47]. I.z.v. EET führte bei allen oben erwähnten LSDs zusätzlich zu einer Abnahme des Speichermaterials und Verbesserung der motorischen [32], [21] bzw. kognitiven [47] Fähigkeiten der Mäuse. Im Fall der GLD konnte sogar eine Verlängerung der Lebensspanne beobachtet werden [64]. Weiterhin konnte in einigen der erwähnten Studien aktives Enzym, sowie eine Degradation des Speichermaterials in der Peripherie nachgewiesen werden [21], [32], [47].

Desweiteren wurde die Aufnahme der applizierten rhASA in verschiedenen neuronale Zellen (Neurone, Oligodendrozyten und Astrozyten) sowie die Sortierung in das lysosomale Kompartiment immunzytochemisch nachgewiesen (siehe Kap. 5.1.6). Die Gruppe um Dodge wies ebenfalls eine zelluläre Aufnahme der administrierten ASM nach [32]. Histologische (siehe Abb. 5.5) und biochemische (siehe Abb. 5.6) Analysen zeigten eine Korrektur des katabolischen Defekts durch die substituierte rhASA in verschiedenen Regionen des ZNS, wobei das Ausmaß der Degradation des Speichermaterials von der lokalen Konzentration der rhASA im Gewebe und dem Zelltyp abhängig war. Die Abnahme der Speicherung wurde geringer, je weiter die Region von der Injektionsstelle entfernt lag. In Phagozyten war auch in weiter entfernten Regionen kein Speichermaterial mehr nachzuweisen. Es ist daher davon auszugehen, dass diese die substituierte rhASA am besten endozytierten. Andererseits ist davon auszugehen, dass Oligodendrozyten die substituierte rhASA weniger erfolgreich endozytieren, da das Speichermaterial nur in Regionen, welche nahe bei der Injektionsstelle liegen, degradiert wurde. Dies zeigt, dass für eine Abnahme des Speichermaterials für Oligodendrozyten eine höhere, lokale Konzentration an substituierter rhASA erforderlich ist als für Phagozyten. Neuronen sprechen auf diese Art der Therapie noch schlechter an. Bei diesen wurde das Speichermaterial nicht abgebaut. Zelltypspezifische Unterschiede wurden auch schon von Ramakrishnan *et al.* 2007 in ASA<sup>-/-</sup> PLP-CST-Mäusen gezeigt [99]. Diese Mäuse speicherten in Phagozyten im Gehirn massiv Sulfatid, was durch die Endozytose der Myelintrümmer zu erklären ist. Demnach wäre es möglich, dass Phagozyten vermehrt ASA endozytieren und so am stärksten von der Therapie profitieren.

Da davon auszugehen ist, dass der Erfolg der i.z.v. EET von der lokalen ASA-Konzentration

abhängt, wäre eine Steigerung wünschenswert, so auch die Erhöhung der lokalen Konzentration der applizierten rhASA im Rückenmark. Die in dieser Arbeit gemessene Halbwertszeit (HWZ) war mit etwa zwei bis drei Stunden sehr gering (siehe Kap. 5.1.4), wohingegen bei intravenösen Applikationen Halbwertszeiten von drei bis vier Tagen erreicht werden konnten [77]. Eine Erklärung für die kurze HWZ könnte die Resorption der Zerebrospinalflüssigkeit geben. Diese wird über die Arachnoidalzotten (Ausstülpungen der Arachnoidea) in das venöse Blut entlassen. Zusätzlich befinden sich an den Spinalnervenzwurzeln kleine Ausstülpungen (Wurzel-taschen), über die die Zerebrospinalflüssigkeit in die Venen filtriert wird. Durch die dauerhafte Neubildung der Zerebrospinalflüssigkeit wird diese sehr schnell vollständig ausgetauscht.

Es gibt verschiedene Wege der direkten Applikation von Substanzen in das ZNS. Dazu zählen die schon erwähnte intrathekale Route, sowie die in dieser Arbeit verwendete i.z.v. Administration in einen lateralen Ventrikel. Bei der intrathekalen Injektion ist eine Absorption der Substanz in den Blutstrom möglich, bevor diese durch die Zerebrospinalflüssigkeit in das Gehirn transportiert wird. In der Studie von Calias *et al.* 2012 wurde die Verweildauer von injizierter I2S im ZNS kontrolliert. Auch hier wurde ein Transfer des administrierten Enzyms von der Zerebrospinalflüssigkeit in die systemische Zirkulation, vermutlich über die Arachnoidalzotten, bei Hunden beobachtet. Dieser Transfer begann direkt nach Injektion, was mit der kurzen HWZ der rhASA von etwa zwei bis drei Stunden korreliert, welche in dieser Arbeit ermittelt wurde.

Eine Möglichkeit zur Steigerung der lokalen ASA-Konzentration könnte die Verwendung höherer Enzymkonzentrationen bieten. Dies erfordert aber eine Produktion großer Enzymmengen und wäre mit hohen Kosten verbunden. Calias *et al.* haben 2012 die intrathekale und die i.z.v. EET miteinander verglichen [19]. Dazu wurde die Verteilung von administrierter, rekombinanter humaner I2S sowohl nach intrathekaler als auch nach i.z.v. EET in Hunden, nicht-menschlichen Primaten und MPS II-Mausmodellen untersucht. Die intrathekale Administration in Hunde und nicht-menschliche Primaten zeigte dabei eine breite Verteilung im Gehirnparenchym und im Rückenmark, sowie eine lysosomale Sortierung in Neuronen und Oligodendrozyten. Nach i.z.v. Injektion zeigte sich ebenfalls eine breite Verteilung des Enzyms im Gehirnparenchym, allerdings nur wenig im Rückenmark. Die i.z.v. Injektion der I2S in Mausmodelle der MPS II zeigte ebenfalls eine breite Verteilung im Gehirnparenchym, sowie eine Abnahme des Speichermaterials. Auch in MPS II-Mäusen wurde nur wenig I2S im Rückenmark gefunden. Die intrathekale Administration des Enzyms im unteren Bereich der Wirbelsäule (lumbosakral), zeigte eine Verteilung der I2S im Gehirn und Rückenmark. Die intrathekale Route bietet demnach eine zusätzliche Therapieoption von LSDs mit ZNS Manifestierung.

Zusätzliche Prozesse wie Proteindegradation könnten zusätzlich zum Verlust der rhASA beitragen [117]. Eine Stabilisierung der infundierten rhASA würde ebenfalls zu einer Erhöhung der lokalen ASA-Konzentration und der Effizienz der i.z.v. EET führen. Dies könnte z.B. durch die Entwicklung von *active-site-specific-chaperons* (ASSC) (siehe Kap. 2.7) erreicht werden, welche die ASA stabilisieren [35]. Auch die Glykosylierung lysosomaler Hydrolasen hat einen wichtigen Einfluss auf deren Stabilität, Aktivität und Oligomerisierung [34], [48].

Weiterhin kann die Veränderung der N-Glykane eine Auswirkung auf die Sortierung der lysosomalen Hydrolasen im Golgi-Apparat haben, sowie zu ihrer Akkumulation im ER führen [94]. Die humane ASA besitzt drei N-Glykosylierungsstellen, hauptsächlich vom *high*-Mannose-Typ [108]. Mit dem Enzym Endoglykosidase H (EndoH) können diese *high*-Mannose-Glykosylierungen abgespalten werden. Die Deglykosylierung der ASA (siehe Abb. 8.4) zeigt, dass rhASA mannosereiche N-Glykane des *high*-Mannose-Typs besitzt, da alle N-Glykane entfernt wurden. In diesem Experiment wird auch gezeigt, dass bei mASA-2 x Strep (siehe Plasmidkarte 8.2) durch Behandlung mit EndoH keine Größenabnahme zu erkennen ist (siehe Abb. 8.4). Dies deutet daraufhin, dass mASA-2 x Strep keine mannosereiche N-Glykosylierung, sondern eher vom hybrid- oder komplex-Typ besitzt. Die Bestimmung der spezifischen Aktivität von mASA-2 x Strep, mit dem artifiziellen Substrat *para*-Nitrocatecholsulfat, ergab etwa 280 U/mg. Die in dieser Arbeit verwendete rhASA besaß eine spezifische Aktivität von 56,1 U/mg. Somit zeigt die mASA-2 x Strep eine fünffach höhere Aktivität als rhASA. Es wäre demnach möglich, dass die veränderte Glykosylierung der mASA-2 x Strep einen Einfluss auf die spezifische Aktivität der mASA-2 x Strep ausübt. Es wurde bereits gezeigt, dass die Entfernung diverser Glykosylierungsstellen, z.B. durch Substitution von Asparagin zu Glutamin, zu einer verminderten spezifischen Aktivität der Heparan N-Sulfatase, ASM oder TPP I führt [27], [37], [130]. Demnach wäre ein Einfluss des N-Glykan-Typs auf die spezifische Aktivität denkbar. Für die  $\beta$ -Glukosidase konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Fibroblasten von Patienten mit Mukopolidose II diese mit nur 36 % Aktivität sezernieren. Ebenso zeigt die  $\beta$ -Galaktosidase aus Mukopolidose II Patienten-Fibroblasten eine verringerte Aktivität [25]. Bei Mukopolidose II und III liegt ein Defekt der GlcNAc-1-Phosphotransferase (siehe Kap. 2.2) vor, was zu einem Fehlen der M6P-Reste führt. Im Zuge dessen werden lysosomale Enzyme fehlsortiert und sezerniert [60]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die sezernierten Enzyme, welche normalerweise N-Glykane des *high*-Mannose-Typs besitzen, zusätzlich Sialinsäure-Reste trugen [41]. Dies weist auf eine Veränderung von *high*-Mannose-Typ N-Glykanen zu komplex-Typ N-Glykane hin. Diese Beispiele zeigen, dass N-Glykane Einfluss auf die Aktivität von lysosomalen Enzymen haben. Eine Modifikation der N-Glykane der rhASA könnte demnach zu einer verbesserten Aktivität der rhASA und somit zur Steigerung der Therapieeffizienz führen.

Die Glykosylierung und der doppel-StrepII-Tag haben keinen Einfluss auf die lysosomale Sortierung der mASA-2 x Strep. Diese wird nach Zugabe zu neuronalen Mischkulturen (siehe Abb. 5.8) lysosomal sortiert. Unter neutralen Bedingungen bildet ASA Dimere. Durch den sauren pH-Wert der Lysosomen bilden je vier ASA-Dimere ein ASA-Oktamer. Dadurch wird die ASA stabilisiert, da eine Kathepsin L Schnittstelle verborgen ist. Diese Abschirmung der Kathepsin L Schnittstelle ist bei mASA-2 x Strep gewährleistet, da diese unter sauren Bedingungen (pH 5) Oktamere ausbildet (siehe Abb. 8.3). Die Fusion des doppel-StrepII-Tags hat demnach keinen negativen Einfluss auf die Aktivität oder die Stabilität der mASA-2 x Strep. Ob der doppel-StrepII-Tag für die erhöhte Aktivität der mASA-2 x Strep verantwortlich ist, muss noch analysiert werden. Dazu könnte rhASA mit dem doppel-StrepII-Tag fusioniert und an-

schließlich die spezifische Aktivität ermittelt werden. Da andere Fusionskonstrukte der hASA allerdings keine erhöhte spezifische Aktivität aufweisen, wie in der Dissertation von Dr. Annika Böckenhoff gezeigt werden konnte [11], ist nicht davon auszugehen, dass der doppel-StrepII-Tag einen Einfluss auf die Aktivität hat. Zur Steigerung der Effizienz der i.z.v. EET könnte eine Glykosylierung und Aktivität der rhASA führen, welche der mASA-2 x Strep entspricht. Somit könnte eine erhöhte spezifische Aktivität der applizierten rhASA zu einer Steigerung des Substratumsatzes, trotz geringerer lokaler Konzentration, führen.

Mittels Lipidanalytik konnte eine Reduktion der Speicherung in der infundierten Hemisphäre von 51-56 % nachgewiesen werden, jedoch keine signifikante Abnahme im Rückenmark (siehe Kap. 5.1.8). Die histologische Analyse zeigte in der infundierten Hemisphäre sogar einen kompletten Verlust der Speicherung (siehe Abb. 5.5). Demnach sind 0,15 % der intravenösen Dosis wesentlich effektiver, wenn diese über i.z.v. EET verabreicht wird und dies trotz verringerter HWZ. Die Abnahme der Speicherung, trotz der geringen HWZ, weist darauf hin, dass die Bindung der rhASA an die Rezeptoren ein schnell verlaufender Vorgang ist. Jiang *et al.* konnten 2013 zeigen, dass Nanopartikel über Clathrin-abhängige Endozytose innerhalb von einer Stunde das Lysosom erreichen [50].

Sechs Monate alte MLD-Mäuse weisen ein asynchrones Schrittmuster im Vergleich zu WT Mäusen auf. Dazu gehören ein breiterer Gang und eine erhöhte Schrittlänge [118]. Die Effizienz der Therapie wurde durch die Analyse der Schrittparameter bestimmt. Dies wurden in der zweiten bis vierten Woche der Behandlung an den immuntoleranten MLD- und WT-Mäusen von Stijen Stroobants (Labor für Biologische Psychologie, Katholische Universität Leuven, Belgien) durchgeführt. Bei der Analyse der Schrittparameter konnten Unterschiede in den einzelnen Gruppen gezeigt werden, welche bereits von Stroobants *et al.* 2008 beobachtet wurden [118]. Abbildung 6.1 zeigt die Analyse des nach Kapitel 4.2.4 ermittelten Schrittmusters der Mäuse. Zu den bestimmten Parametern zählten:

- die Schrittbreite vorne und hinten (kontralaterale Fußabdrücke)
- der Abstand des Vorderpfoten Abdrucks und folgendem Hinterpfoten Abdrucks
- die Schrittlänge rechts und links (folgende Abdrücke der gleichen Pfote)

Diese sind in den in Abbildung 6.1 Diagrammen dargestellt.

Die vordere und hintere Schrittlänge rechts und links (siehe Abb. 6.1 A) sowie der Inkongruenzkoeffizient (IK), als Maß für die Gleichmäßigkeit der Schrittbreite, waren bei scheinbehandelten ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen, im Vergleich zu WT-Mäusen, erhöht (siehe Abb. 6.1 B). Dies führte bei ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen zu einer unharmonischen Schrittdynamik. Der IK wird für die Ermittlung der Gleichmäßigkeit von zwei Schrittparametern herangezogen. Zwei Parameter können hierbei z.B. die Schrittlänge links ( $Sl_{li}$ ) und rechts ( $Sl_{re}$ ) sein und wird wie folgt berechnet (std.abw. =

Standardabweichung):

$$IK = \left| \frac{Sl_{li} - \overline{Sl_{li}}}{Sl_{li, std.abw.}} - \frac{Sl_{re} - \overline{Sl_{re}}}{Sl_{re, std.abw.}} \right|$$

Durch i.v.z. EET wurde das asynchrone Schrittmuster korrigiert und war dem der WT-Mäuse ähnlich. Ebenso wurde die Schrittbreite vorne und hinten nach i.z.v. EET auf WT-Level reguliert. Der Abstand des hinteren zum vorderen Fußabdruck wurde sowohl links als auch rechts nach i.z.v. EET signifikant verbessert. Eine signifikante Verbesserung konnte nach i.z.v. EET auch für den IK der Schrittbreite hinten/vorne als auch für die Schrittlänge links/rechts und vorne/hinten festgestellt werden.

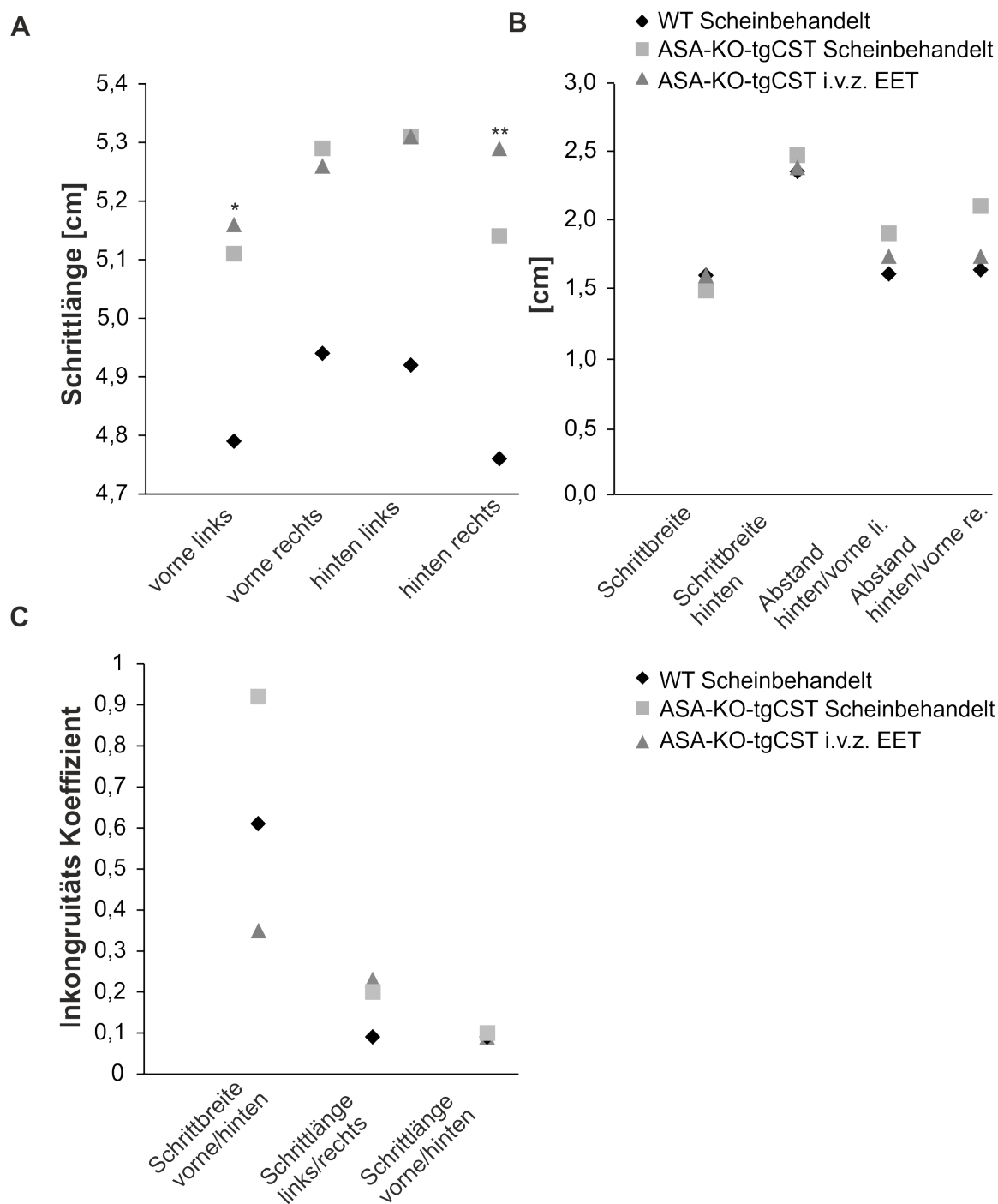
Auch ASA<sup>-/-</sup> PLP-CST-Mäuse zeigten ein asynchrones Laufverhalten. Allerdings wurde nach i.z.v. EET nur der IK der Schrittlänge hinten/vorne signifikant auf WT-Niveau verbessert (siehe Abb. 6.1 C). Vorangegangene Studien einer intravenösen Behandlung von ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen mit 4 mg/kg rhASA führten zu einer Verbesserung der Speicherung im PNS aber nicht im ZNS. Interessanterweise wird bei dieser Methode die Schrittlänge normalisiert. Auch konnte, im Gegensatz zur i.z.v. EET, eine Reduktion der Speicherung im zervikalen Rückenmark um 45 % erreicht werden, wenn 50 mg/kg rhASA injiziert wurden [78]. Die erweiterte Schrittlänge könnte somit ein Parameter sein, welcher durch eine PNS-Dysfunktion bzw. durch eine Schädigung des Spinaltrakts des Rückenmarks zustande kommt, da hohe Enzymkonzentrationen bei intravenöser EET sowohl im PNS als auch im Rückenmark zu einer Abnahme des Speichermaterials führen.

Einen weiteren Hinweis für eine PNS-Abhängigkeit der Schrittlänge liefert die Alzianblaufärbung des Rückenmarks (siehe Abb. 5.5). Obwohl im Kortikospinaltrakt der weißen Substanz des Rückenmarks von ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen eine Verminderung der Speicherung zu erkennen ist, hat dies keine Auswirkung auf die ungleichmäßigen Schrittlängen. Sowohl das Zerebellum als auch die Pons übernehmen wichtige Aufgaben in der Koordination der Motorfunktionen. Trotz fehlender, signifikanter Reduktion der Speicherung im Zerebellum und der Pons wurde die Asynchronie des Schrittmusters verbessert. Eine Kombinationstherapie aus i.z.v. EET und niedrig-Dosis intravenöser EET könnte demnach alle Parameter der verschlechterten Gangart korrigieren, da sowohl die Sulfatidspeicherung im PNS und Rückenmark über intravenöse EET abnimmt, als auch das Gehirn durch i.z.v. EET profitiert.

Bei i.z.v. EET wurde im Gegensatz zu intravenöser EET mehr Speichermaterial im Gehirn degradiert, obwohl wesentlich geringere Enzymdosen verwendet wurden. Zusätzlich wurden Schrittparameter verbessert, welche durch intravenöse EET nicht korrigiert wurden, wie z.B. die Schrittbreite. Schrittparameter, die bei intravenöser EET, aber nicht bei i.z.v. EET, berichtigt werden, könnten durch eine Kombinationstherapie korrigiert werden.

Die i.z.v. EET wäre eine mögliche Therapieoption für MLD und andere LSDs mit ZNS Beteiligung, da Pumpen bzw. i.z.v. Injektionen schon beim Menschen eingesetzt werden (z.B. bei der Schmerztherapie [112]). Zudem wurde die kontinuierliche Administration des glialen, neurotrophen Faktors (GDNF) in zerebrale Ventrikel zur Behandlung von Parkinson verwendet [91].





**Abbildung 6.1: Analyse des Schrittmusters von behandelten und scheinbehandelten  $ASA^{-/-}$  und  $ASA^{-/-}$  PLP-CST-Mäusen.**

A: Abstand in cm für die Schrittbreite und den Abstand der aufeinanderfolgenden Fußabdrücke für  $ASA^{-/-}$ -Mäuse. B: IK der Schrittbreite vorne/hinten sowie den Schrittlängen für  $ASA^{-/-}$ -Mäuse. C: IK der Schrittbreite vorne/hinten sowie den Schrittlängen für  $ASA^{-/-}$  PLP-CST-Mäuse. Statistisch signifikante Abnahmen nach Behandlung sind mit einem Stern markiert \* $p \leq 0,05$  \*\* $p \leq 0,01$  \*\*\* $p \leq 0,001$  Mittelwerte ( $n = 7-8$ ) Diese Untersuchungen wurden von Stijen Stroobants im Rahmen einer Kooperation durchgeführt

Durch eine wöchentliche i.z.v. Injektion von GDNF konnte die Motorik der Parkinson-Patienten bis zu 63 % verbessert werden.

## 6.2 Zelltypspezifische Unterschiede der Endozytose

Die Ergebnisse von Kapitel 5.1.7 zeigen Unterschiede des Therapieerfolges in verschiedenen Zelltypen. Die zelluläre Aufnahme ist von einer Vielzahl von Faktoren, wie der Affinität des Rezeptors zum Liganden, der Dichte des Rezeptors in der Plasmamembran, der Internalisierungsrate des Rezeptor-Liganden-Komplex sowie dem Ausmaß des Rezeptor-Recyclings und der Synthese neuer Rezeptoren, abhängig.

Um die Unterschiede des Therapieerfolges genauer zu untersuchen, wurden neuronale Primärkulturen präpariert und diese mit rhASA gefüttert. Dies diente der Ermittlung der aufgenommenen Mengen, sowie der Ermittlung des Rezeptors, über den die ASA endozytiert wurde. Zur Entfernung Oberflächen-gebundener rhASA wurden die Zellen nach Inkubation mit einem aziden Puffer gewaschen. Die Auswertung erfolgte mittels ELISA zur Ermittlung der Menge aufgenommener rhASA und Immunzytochemie zur Kontrolle der lysosomalen Sortierung. In neuronalen Mischkulturen konnte gezeigt werden, dass Mikroglia trotz Kompetition des Mannose-6-Phosphat-Rezeptors (MPR300) mit Mannose-6-Phosphat (M6P) rhASA endozytierten (siehe Abb. 5.8). Es muss also noch weitere Wege geben, über welche die rhASA von Mikroglia aufgenommen werden kann. Zur Ermittlung beteiligter Rezeptoren bei der Endozytose von rhASA in Mikroglia wurden verschiedene Inhibitoren in das Kultivierungsmedium gegeben. Dazu zählten M6P (zur Kompetition des MPR300), Mannose und Mannan (Inhibition des Mannose-Rezeptors [55]) sowie Dextran-Sulfat (Kompetition der *scavenger*-Rezeptoren Klasse A [123]) (siehe Abb. 5.11). Erst die gemeinsame Verwendung von M6P, Mannose, Mannan und Dextran-Sulfat hemmte die rhASA Aufnahme nahezu komplett. Dies zeigt, dass nicht nur der MPR300 sondern auch andere Rezeptoren eine Rolle bei der Aufnahme von rhASA in Mikroglia übernehmen. Dass der MPR300 nur einen geringen Anteil von 34 % an der Endozytose lysosomaler Enzyme bei Makrophagen hat, konnte schon von Diment und Dean 1983 gezeigt werden [30]. Sie zeigten, dass Mannose-enthaltende Komponenten die Aufnahme von  $\beta$ -Glukuronidase in Makrophagen inhibiert, jedoch nicht in Fibroblasten. M6P hingegen hemmt die Aufnahme der  $\beta$ -Glukuronidase in Fibroblasten komplett, hat aber nur einen geringen Einfluss auf die Aufnahme der  $\beta$ -Glukuronidase in Makrophagen.

Der Grad der Inhibition variierte zwischen den einzelnen unabhängigen Experimenten. Mannose inhibierte die rhASA Endozytose in primären Mikroglia über den Mannose Rezeptor um 30-60 %. Mannan, ebenfalls ein Inhibitor des Mannose Rezeptors, war in der Lage, die Endozytose in Mikroglia um 30-60 % zu inhibieren. Durch Dextran-Sulfat, und dessen kompetitiver Inhibition der Klasse A *scavenger* Rezeptoren, wird die Endozytose in Mikroglia ebenfalls um 30-60 % gehemmt. Die Endozytose von rhASA in Mikroglia findet demnach nicht nur über den MPR300 statt, sondern ist auch von anderen Rezeptoren, wie dem Mannose und den *sca-*

venger Rezeptoren, abhängig. Die erfolgreiche Abnahme der Speicherung in Phagozyten, auch in weiter entfernten Regionen zur Injektionsstelle (siehe Abb. 5.5), lässt sich dadurch erklären, dass Phagozyten auch MPR300 unabhängig endozytieren und verschiedene Wege besitzen, die rhASA zum lysosomalen Kompartiment zu befördern. Die Endozytose über verschiedene Rezeptoren der applizierten rhASA bei i.z.v. EET könnte in Phagozyten zu der vollständigen Degradation des Speichermaterials des Stammhirns, unabhängig von der lokalen rhASA Konzentration, geführt haben.

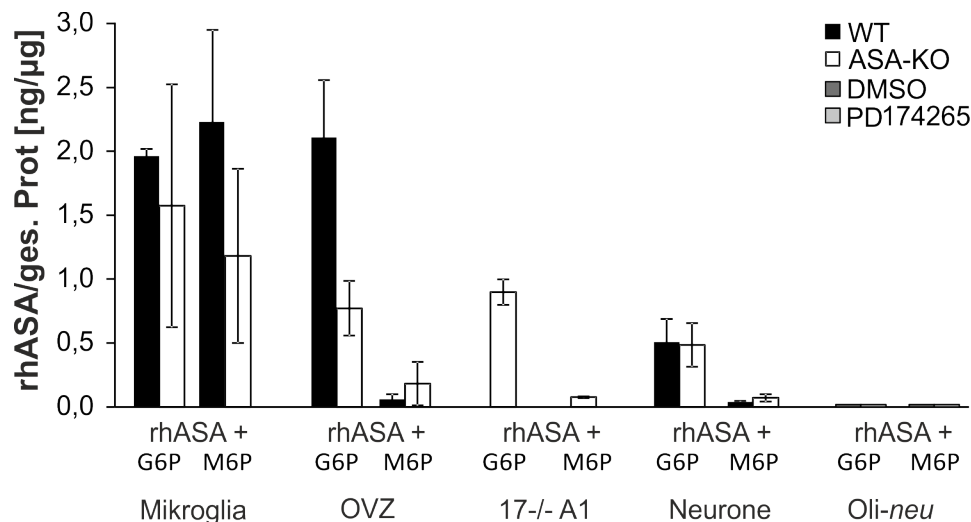
Primäre Neurone zeigten eine MPR300 abhängige Endozytose der rhASA von 0,5 ng rhASA pro  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein (siehe Abb. 5.16). Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Neurone nicht so effektiv endozytieren wie Mikroglia und erklären, warum Neurone des Stammhirns nicht von der i.z.v. EET profitierten.

Da die Präparationen von Astrozyten keine Reinkultur ergab, wurden zur Endozytoseanalytik die ASA-defiziente Zelllinie 17/- A1 verwendet. An dieser konnte eine MPR300-abhängige rhASA Endozytose von 0,9 ng rhASA pro  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.14). An primären WT- oder ASA<sup>-/-</sup>-Astrozyten konnte immunzytochemisch allerdings keine Aufnahme nachgewiesen werden (siehe Abb. 5.12). Dies deutet entweder darauf hin, dass Astrozyten rhASA nicht endozytieren, oder die Detektionsgrenze des Antikörpers erreicht wurde. Andererseits könnte eine genetische Veränderung der immortalisierten Astrozyten die Regulation verschiedener Gene (z.B. für Rezeptoren) beeinflussen [114], [12]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass primäre Astrozyten aus Ratten einen Mechanismus zur Rezeptor-vermittelten Endozytose besitzen [66], [81]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass murine  $\beta$ -Glukuronidase über Rezeptor-vermittelte Endozytose, von primären Astrozyten aus Ratten, aufgenommen und lysosomal sortiert werden kann [49]. Die Detektion der  $\beta$ -Glukuronidase erfolgte über Immunzytochemie. Durch eine immunhistochemische Färbung eines Sagittalschnitts des Gehirns von mit i.z.v. behandelten ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen (siehe Abb. 5.4), konnte ebenfalls eine Endozytose des applizierten Enzyms in Astrozyten gezeigt werden. Warum eine Endozytose der rhASA in kultivierten, primären Astrozyten aus der Maus in der vorliegenden Arbeit immunzytochemisch nicht nachgewiesen werden konnte, ist noch unklar. Da aufgrund der immunhistochemischen Ergebnisse, sowie den Belegen aus der Literatur gezeigt werden konnte, dass primäre Astrozyten lysosomale Enzyme endozytierten, ist davon auszugehen, dass nicht genügend rhASA endozytiert wurde, um die Detektionsgrenze des Antikörpers zu erreichen.

Ebenfalls einen Unterschied bei der Endozytose von rhASA zeigte der Vergleich von primären Oligodendrozyten-Vorläuferzellen (OVZ) und der OVZ-Zelllinie Oli-neu (siehe Abb. 5.20 und 5.22). Primäre OVZ aus WT-Mäusen nahmen dabei etwa 2 ng rhASA pro  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein auf, wohingegen undifferenzierte und differenzierte Oli-neu-Zellen nur 0,01 ng/ $\mu\text{g}$  rhASA aufnahmen. Die Endozytose von ASA in eine andere OVZ-Zelllinie (CG-4) wurde schon von Sangalli *et al.* 1998 gezeigt [106]. Die Endozytose von ASA von einer OVZ-Zelllinie ist demnach möglich. Ein Unterschied der beiden OVZ-Zelllinien, welcher eine Auswirkung auf

die Endozytose haben könnte, ist die Art der Immortalisierung. CG-4 Zellen entstanden spontan aus einer primären, neuronalen Kultur [67], wohingegen Oli-*neu*-Zellen durch Transduktion mit der t-*neu* Rezeptor-Tyrosinkinase (RTK) immortalisiert wurden [52]. Das t-*neu* Onkogen ist durch eine Punktmutation in der Transmembranregion des c-*neu* Proto-Onkogens (auch ErbB2 und HER2 [82]) und kodiert für eine konstitutiv aktive RTK [52]. Die konstitutive Aktivität der RTK könnte die Endozytose hemmen, da eine Überexpression des ErbB2 Proto-Onkogens die Bildung von Clathrin-Vesikeln und damit die Internalisierung ligandengebundener EGF-Rezeptoren verhindert [45].

Für einen Vergleich der Endozytose von verschiedenen primären Zellen wurde die Menge von endozytierter rhASA in primäre Mikroglia, 17/- A1-Zellen, primäre Neurone, und primäre OVZ in einem Diagramm zusammengestellt (siehe Abb. 6.2). Schwarze Balken repräsentieren dabei Zellen aus WT-Mäusen und weiße Balken Zellen aus ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen. Dunkelgraue Balken kennzeichnen undifferenzierte Oli-*neu*-Zellen, hellgraue Balken mit PD174265 differenzierte Oli-*neu*-Zellen.



**Abbildung 6.2: Vergleich der rhASA Aufnahme in verschiedene Zelltypen des Gehirns.** Primäre Mikroglia, 17/- A1-Zellen, primäre Neurone und primäre OVZ, aus WT- (schwarze Balken) und ASA<sup>-/-</sup>- (weiße Balken) Mäusen wurden in 5  $\mu$ g/ml rhASA, unter Zugabe von 7,5 mM G6P/M6P, gefüttert. Zusätzlich wurden undifferenzierte (dunkelgraue Balken) und mittels PD174265 differenzierte (hellgraue Balken) Oli-*neu*-Zellen gefüttert. Die Aufnahme ist als ng rhASA pro  $\mu$ g Gesamtprotein gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen (n = 3).

Mikroglia nahmen etwa 2 ng/ $\mu$ g rhASA auf, was durch die Konkurrenz mit M6P nicht wesentlich behindert wurde. Dies deutet auf eine teilweise MPR300-unabhängige Endozytose der rhASA hin. Im Gegensatz dazu endozytieren andere neuronale Zelltypen rhASA nahezu ausschließlich MPR300-abhängig. Allerdings war die Endozytose von OVZ aus ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen mit ca. 0,8 ng/ $\mu$ g um ca. 60 % geringer als die von OVZ aus WT-Mäusen mit ca. 2 ng/ $\mu$ g. Dieser Genotyp-abhängige Unterschied in der Effizienz der rhASA Aufnahme war bei keinen anderen neuronalen Zelltypen zu beobachten. Die Endozytose der ASA-defizienten Astrozyten Zelllinie

17-/- A1 lag bei ca. 0,9 ng/ $\mu$ g, von primären Neuronen bei ca. 0,5 ng/ $\mu$ g und auch diese war MPR300-abhängig. Sowohl undifferenzierte als auch differenzierte Oli-*neu*-Zellen nahmen nur etwa 0,01 ng/ $\mu$ g rhASA auf.

Die Menge an endozytierter ASA von Neuronen und Astrozyten mit 0,5 ng/ $\mu$ g bzw. 0,9 ng/ $\mu$ g ist dabei deutlich geringer als die von Mikroglia und OVZ aus WT-Mäusen mit etwa 2 ng/ $\mu$ g. Eine Erklärung hierfür könnte die Studie von Schluff *et al.* 1998 liefern [107]. Diese untersuchten u.a. die Verteilung von MPR300 in verschiedenen neuronalen Zellen. Dabei zeigte sich, dass sich nur wenige davon auf der Oberfläche von Astrozyten und Neuronen befinden, was die verringerte Aufnahme von rhASA erklären könnte.

Der Vergleich aller Zelltypen in Abbildung 6.2 zeigt zudem, dass OVZ als einziger neuro-naler Zelltyp eine Genotyp-abhängige Endozytoseeffizienz besitzen. Während OVZ aus WT-Mäusen etwa 2 ng/ $\mu$ g rhASA endozytieren, ist die Endozytose bei OVZ aus ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen um etwa 60 % verringert. Eine ähnliche Genotyp-abhängige Aufnahme konnte schon 2009 von Klein *et al.* gezeigt werden [56]. Allerdings ist hier die Endozytoserate gegensätzlich; Sulfatid-speichernde, primäre Nierenzellen von ASA-defizienten Mäusen endozytieren mehr als zwei-mal so viel Enzym als WT-Nierenzellen. Ein Grund hierfür ist die erhöhte Internalisierungs-rate des MPR300. Genotyp-spezifische Unterschiede der Endozytose konnten auch bei ande-ren LSDs beobachtet werden, zum Beispiel bei der Niemann-Pick oder Tay-Sachs Krankheit. Die Niemann-Pick-Krankheit führt vor allem zu einer Anreicherung von Sphingomyelin, in Makrophagen. Diese lipidreichen Makrophagen der Niemann-Pick-Krankheit akkumulieren in verschiedenen Geweben. Dhami und Schuchman konnten 2003 zeigen, dass alveolare Makro-phagen von ASM-KO Mäusen zwar eine erhöhte Bindung von extrazellulärer rhASM zeigen, die Endozytose jedoch im Vergleich zu normalen Zellen reduziert war. rhASM wird sowohl ab-hängig vom Mannose-Rezeptor als auch vom MPR300 endozytiert. Die Zugabe von Mannan zu Zellkulturen führte zu einer Reduzierung der rhASM Endozytose bei ASM-KO Makrophagen um etwa 60 %, M6P hatte keinen Einfluss. Dies deutet darauf hin, dass die MPR300-abhängige Endozytose bei ASM-KO Makrophagen gestört ist. In ASM-KO Makrophagen waren aller-dings, im Vergleich zu normalen Zellen, mehr MPR300 Rezeptoren vorhanden. Die Lipidak-kumulation führt demnach zu einer Störung der MPR300 Sortierung [26]. Da an ASA<sup>-/-</sup>-OVZ ebenfalls eine verringerte Aufnahme der rhASA festgestellt werden konnte, wäre eine Untersu-chung der Internalisierungsrate und der Verteilung des MPR300 interessant.

Bei der Tay-Sachs Krankheit akkumulieren GM2-Ganglioside, welche normalerweise konti-nuierlich, durch sequentielle Abspaltung der endständigen Zucker, durch die  $\beta$ -Hexosaminidase A abgebaut werden. Martino *et al.* versuchten 2002 durch Kreuzkorrektur mittels Rezeptor-abhängigem Gentransfer, den Gangliosidmetabolismus wieder herzustellen [70]. Das in dem konditionierten Medium von  $\beta$ -Hexosaminidase A überexprimierenden, humanen Fibroblasten enthaltene Enzym sollte von Fibroblasten aus Tay-Sachs-Patienten endozytiert werden. Die Pa-tientenzellen endozytierten in großer Menge das angebotene Enzym, jedoch wurde dieses nicht lysosomal sortiert. Die Lipidakkumulation, welche den Transport entlang der lysosomalen Rou-

te stört, wird als Erklärung für diesen Defekt dargelegt. Es konnte in Abb 5.18 mittels IZC gezeigt werden, dass OVZ aus ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen das aufgenommene Enzym korrekt lysosomal sortierten, so dass diese Problematik bei ASA<sup>-/-</sup>-Zellen nicht vorhanden ist.

Ein Experiment dieser Arbeit (durchgeführt von Dr. Ulrich Matzner siehe Abb. 8.5) zeigte, dass ASA-defiziente Fibroblasten ASA aus Mikroglia nicht endozytieren, wohingegen ASA, die aus mASA-überexprimierenden CHO-S-Zellen stammt, MPR300-abhängig endozytiert werden konnte. In Abbildung 8.5 ist auch zu erkennen, dass ASA-defiziente Fibroblasten auch in CHO-S-Zellen produzierte ASA endozytieren, wenn der MPR300 durch M6P kompetitiert wurde. Über welchen Weg die ASA von den ASA-defizienten Fibroblasten aufgenommen wurde, ist nicht untersucht worden. Es wurde allerdings schon gezeigt, dass Fruktose-1-Phosphat (F1P) die Endozytose in Fibroblasten teilweise inhibiert [30] [104]. In weiteren Endozytoseexperimenten, mit Fibroblasten als Akzeptorzellen, könnte F1P als weiterer Inhibitor der Endozytose dienen.

Auch Muschol *et al.* konnten 2002 in einem ähnlichen Experiment zeigen, dass lysosomale Enzyme, welche von BV2-Zellen sezerniert werden, aufgrund fehlender Phosphorylierung der Mannosereste nicht endozytiert werden können. Weiterhin wurde von dieser Arbeitsgruppe postuliert, dass in primären humanen Makrophagen die Sortierung lysosomaler Enzyme MPR-unabhängig stattfindet [83].

Die Sekretion lysosomaler Enzyme von Monozyten bzw. Makrophagen und deren MPR300-abhängige Aufnahme in umgebende Zellen ist Hauptbestandteil des therapeutischen Konzepts der KMT zur Therapie von LSDs. Vom Knochenmark stammende Zellen können die BHS überqueren und zu perivaskulären Mikroglia differenzieren [3], [36], [63].  $\beta$ -Hexosaminidase-defiziente Mäuse (ein Mausmodell für die Sandhoff Krankheit), an denen eine KMT praktiziert wurde, zeigten weder eine Erhöhung des  $\beta$ -Hexosaminidase-Spiegels in Neuronen noch eine Verminderung des Speichermaterials [88]. Die dennoch minimal verbesserte Symptomatik, sowie die erhöhte Lebenserwartung dieser Mäuse, beruht auf der Unterdrückung der Mikrogliaaktivierung [124].

Das Fehlen der M6P-Reste könnte eine Erklärung liefern, warum Zellen das von Makrophagen bzw. Mikroglia sezernierte Enzym nicht endozytieren. Mikroglia hingegen endozytieren auch MPR300 unabhängig (siehe Abb. 5.11) und sind demnach dazu fähig lysosomale Enzyme ohne M6P-Reste zu endozytieren. Dies könnte erklären warum die Speicherung in Mikroglia bei KMT abnimmt und dies zur teilweisen Verbesserung der Symptome führt. Bei der MLD spielt die Aktivierung der Mikroglia eine Rolle bei der Pathogenese [42], [46]. Bei der hämatopoetischen Stammzell-Gentherapie (HSZT), welche bei drei präsymptomatischen, spät infantilen MLD-Patienten durchgeführt wurde, könnte die Unterdrückung der Mikrogliaaktivierung ein Grund für die Verbesserung der MLD-Symptomatik sein [9]. Hierbei wurde ein lentiviraler Vektor genutzt, um die intakte hASA cDNA in HSZ der MLD-Patienten zu transduzieren. Nach Re-Infusion der transduzierten HSZ konnte eine hohe ASA Expression in hämatopoetischen Zellen und der Zerebrospinalflüssigkeit festgestellt werden. Die Patienten zeigten innerhalb von

sieben bis 21 Monaten keine Manifestation oder ein Fortschreiten der Krankheit. Neuronale Zellen, außer den Mikroglia, können die intakte ASA aufgrund des fehlenden M6P nicht endozytieren, somit bliebe die Speicherung in Oligodendrozyten und Neuronen bestehen. Durch diese Therapie wird die Progression der Krankheit also nur verzögert und nicht verhindert. Diese Verzögerung der Symptome konnte bei Mäusen auch schon durch EET mit einer wöchentlichen Dosis von 20 mg/ml rhASA erzielt werden [72]. In dieser Studie profitierten junge Mäuse, bei denen noch keine Symptome zu erkennen waren, am besten von der EET. Bei älteren Mäusen konnte nach Beginn der Symptome nur die Progression dieser verhindert werden. Da eine frühe Diagnose der MLD, aufgrund eines fehlenden Neugeborenen Screenings, nicht möglich ist, wird eine MLD-Erkrankung allerdings nicht vor Ausbruch erkannt. Die Notwendigkeit einer frühen Diagnostik wurde schon von Dierenfeld *et al.* 2010 erkannt [29]. Hierbei führt ein früher Beginn einer intrathekalen Therapie zu einem erhöhten Rückgang der Speicherung bei MPS I.

Da die KMT aufgrund der nicht endozytosefähigen, von Makrophagen und Mikroglia sekretierten ASA, nicht zum erwünschten Rückgang der Speicherung in Oligodendrozyten und Schwannzellen führen kann, ist eine Optimierung der EET unerlässlich. Verschiedene Studien zeigen, dass die Zerebrospinalflüssigkeit als Route für die zentralnervöse Verteilung von lysosomalen Enzymen dienen kann [19], [21], [32], [126] [132]. Die i.z.v. EET, liefert für alle Zelltypen endozytosefähige ASA und ist somit ein guter Ansatz zur Therapie von MLD. Durch i.z.v. EET werden Symptome, wie die erweiterte Schrittbreite, verbessert, die bei bisherigen Therapieversuchen unverändert blieben [78]. Da die applizierte rhASA allerdings nicht in alle Regionen des ZNS vordringen konnte und eine Reduktion des Speichermaterials in diesen ausblieb, muss eine Möglichkeit gefunden werden, die Verteilung der rhASA zu verbessern. Wie schon erwähnt, könnte eine Kombinationstherapie von i.z.v. EET und intravenöser EET den gewünschten Effekt erzielen, da dadurch sowohl eine Reduktion der Speicherung im Gehirn als auch im Rückenmark erreicht werden könnte. Zudem wurde bei intravenöser EET, auch bei geringen ASA-Konzentrationen, eine Verbesserung der Schrittlänge erreicht. Allerdings wurde mit intravenöser EET nur bei hohen Konzentrationen (20 mg/ml) eine Reduktion der Speicherung im Rückenmark erzielt. Da die intrathekale Route für die Enzymadministration weniger invasiv ist als der intraventrikuläre Weg, wäre auch die Kombination von i.z.v. EET und intrathekaler EET eine Möglichkeit. Durch die Abgabe der Zerebrospinalflüssigkeit, und somit der darin enthaltenen, administrierten rhASA über die Wurzeltaschen der Spinalnerven kann diese bei intrathekaler EET schneller in das venöse Blut gelangen. Gleichzeitig ist eine Versorgung des Rückenmarks mit administrierter rhASA gewährleistet. Um dennoch eine Verteilung über das gesamte Gehirnparenchym zu erreichen, ist die gleichzeitige i.z.v. EET unabdingbar.

Eine weitere Möglichkeit, die ASA Verteilung im ZNS zu verbessern, wäre die Nutzung bilateraler Pumpen. Bei diesen endet der Katheter der osmotischen Minipumpen in zwei Kanülen, durch die beide lateralen Ventrikel infundiert werden können. Seit Dezember 2011 werden Patienten für eine klinische Studie zur intrathekalen Administration von rhASA rekrutiert. Es sollen verschiedene Dosen (10 mg, 30 mg und 100 mg) wöchentlich für 38 Wochen intrathe-

kal in MLD Patienten bis zwölf Jahren appliziert werden [111]. Aufgrund der vorzuweisenden Erfolge sowohl histologisch (siehe Kap. 5.1.7), biochemisch (siehe Kap. 5.1.8) als auch neurologisch (siehe Abb. 6.1) mittels i.z.v. EET bei MLD-Mäusen wäre zu überlegen auch die i.z.v. EET für eine klinische Studie in Betracht zu ziehen, evtl. auch in Kombination mit der laufenden intrathekalen EET.

Zur Untersuchung der zelltyp-abhängigen Endozytose, ist eine Reproduktion der Ergebnisse des Transfers radioaktiv markierter ASA unerlässlich. Zudem wären weitere Untersuchungen mittels radioaktiv markierter ASA, zur Fütterung von primären Zellen wie OVZ, differenziierten Oligodendrozyten, Neuronen und Astrozyten mit mikroglialer ASA von großer Bedeutung. Dies könnte einen Aufschluss darüber geben, ob neuronale Zellen mikrogliale ASA endozytieren. Damit könnte die Frage geklärt werden, ob mittels KMT die sulfatidspeichernden Zellen therapiert werden können. Auch wäre die Untersuchung der Endozytose von mikroglialer ASA in primäre Mikroglia interessant. Aufgrund der verschiedenen, an der Endozytose beteiligten, Rezeptoren sollten Mikroglia fähig sein mikrogliale ASA zu endozytieren. Um die Fähigkeit der Kreuzkorrektur zwischen Zellen auch für ASA zu belegen, sollte der Transfer von radioaktiv markierter ASA zwischen primären neuronalen Zellen untersucht werden. Der Vergleich der Endozytoserate von OVZ und primären Oligodendrozyten aus WT- und ASA<sup>-/-</sup>-Mäusen sollte weiter untersucht werden, um einen eventuellen Unterschied der Endozytosefähigkeit von ASA-defizienten Zellen im Vergleich zu WT-Zellen festzustellen. Um die exakte Menge endozytierter, muriner ASA (z.B. aus Mikroglia) zu bestimmen und eine sensitivere Methode zur murinen ASA Bestimmung zu etablieren, wäre die Generierung gepaarter Antikörper für die Entwicklung eines murinen ASA ELISAs essentiell. Die schon für Endozytoseversuche klonierte mASA-2 x Strep könnte dafür genutzt werden.



# Literaturverzeichnis

- [1] ABBOTT, N.J. ; PATABENDIGE, Adjanie a K. ; DOLMAN, Diana E M. ; YUSOF, Siti R. ; BEGLEY, David J.: Structure and function of the blood-brain barrier. In: *Neurobiology of disease* 37 (2010), Januar, Nr. 1, S. 13–25. – ISSN 1095–953X
- [2] ALLEN, Nicola J. ; BARRES, Ben A.: Glia - more than just brain glue. 457 (2009), Nr. February, S. 675–677
- [3] ARNOLD, Tom ; BETSHOLTZ, Christer: The importance of microglia in the development of the vasculature in the central nervous system. In: *Vascular cell* 5 (2013), Januar, Nr. 1, S. 4. – ISSN 2045–824X
- [4] ASHEUER, Muriel ; PFLUMIO, Françoise ; BENHAMIDA, Sonia ; DUBART-KUPPERSCHMITT, Anne ; FOUQUET, Françoise ; IMAI, Yoshinori ; AUBOURG, Patrick ; CARTIER, Nathalie: Human CD34+ cells differentiate into microglia and express recombinant therapeutic protein. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2004), März, Nr. 10, S. 3557–62. – ISSN 0027–8424
- [5] AUSUBEL, F.A., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K.: *Current protocols in molecular biology*. Greene Pub. 1987
- [6] BALLABIO, Andrea ; GIESELMANN, Volkmar: Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. In: *Biochimica et biophysica acta* 1793 (2009), April, Nr. 4, S. 684–96. – ISSN 0006–3002
- [7] BAUMANN, N ; PHAM-DINH, D: Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. In: *Physiological reviews* 81 (2001), April, Nr. 2, S. 871–927. – ISSN 0031–9333
- [8] BECK, Michael: New therapeutic options for lysosomal storage disorders: enzyme replacement, small molecules and gene therapy. In: *Human Genetics* 121 (2007), Nr. 1, S. 1–22
- [9] BIFFI, Alessandra ; MONTINI, Eugenio ; LORIOLI, Laura ; CESANI, Martina ; FUMAGALLI, Francesca ; PLATI, Tiziana ; BALDOLI, Cristina ; MARTINO, Sabata ; CALABRIA, Andrea ; CANALE, Sabrina ; BENEDICENTI, Fabrizio ; VALLANTI, Giuliana ; BIASCO, Luca ; LEO, Simone ; KABBARA, Nabil ; ZANETTI, Gianluigi ; RIZZO, William B. ; MEHTA, Nalini a L. ; CICALESE, Maria P. ; CASIRAGHI, Miriam ; BOELEN, Jaap J. ; DEL CARRO, Ubaldo ; DOW, David J. ; SCHMIDT, Manfred ; ASSANELLI, Andrea ; NEDUVA, Victor ; DI SERIO, Clelia ; STUPKA, Elia ; GARDNER, Jason ; KALLE, Christof von ; BORDIGNON, Claudio ; CICERI, Fabio ; ROVELLI, Attilio ; RONCAROLO, Maria G. ; AIUTI, Alessandro ; SESSA, Maria ; NALDINI, Luigi: Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. In: *Science (New York, N.Y.)* 341 (2013), August, Nr. 6148, S. 1233158. – ISSN 1095–9203
- [10] BLASI, E ; BARLUZZI, R ; BISTONI, F: immortalization of murine microglial cells by a carrying retrovirus. In: *Molecular and Cellular Biology* 27 (1990), S. 229–237
- [11] BÖCKENHOFF, Annika: *Enzyersatztherapie der metachromatischen Leukodystrophie Untersuchungen zur Steigerung des Übertritts der Arylsulfatase A über die Blut - Hirn - Schranke durch die Verwendung von Peptidvektoren*. 2013
- [12] BOESS, Franziska ; KAMBER, Markus ; ROMER, Simona ; GASSER, Rodolfo ; MULLER, Dieter ; ALBERTINI, Silvio ; SUTER, Laura: Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes, and liver slices compared to the in vivo liver gene expression in rats: possible implications for toxicogenomics use of in vitro systems. In: *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology* 73 (2003), Juni, Nr. 2, S. 386–402. – ISSN 1096–6080
- [13] BOTTENSTEIN, Jane E. ; GORDON, H: Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium *Neurobiology* :. 76 (1979), Nr. 1, S. 514–517
- [14] BOU-GHARIOS, G ; ABRAHAM, D ; OLSEN, I: Lysosomal storage diseases: mechanisms of enzyme replacement therapy. In: *The Histochemical journal* 25 (1993), September, Nr. 9, S. 593–605. – ISSN 0018–2214
- [15] BRADY RO, PENTCHEV PG, GAL AE, HIBBERT SR, Dekaban A.: Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. Use of purified glucocerebrosidase in Gaucher's disease. In: *N Engl J Med*. 291 (1974), Nr. 19, S. 989–93
- [16] BRAULKE, Thomas ; BONIFACINO, Juan S.: Sorting of lysosomal proteins. In: *Biochimica et biophysica acta* 1793 (2009), April, Nr. 4, S. 605–14. – ISSN 0006–3002
- [17] BRAZELTON, T. R.: From Marrow to Brain: Expression of Neuronal Phenotypes in Adult Mice. In: *Science* 290 (2000), Dezember, Nr. 5497, S. 1775–1779
- [18] BÜLOW, Rixa von ; SCHMIDT, Bernhard ; DIERKS, Thomas ; SCHWABAUER, Nelli ; SCHILLING, Klaus ; WEBER, Ekkehard ; USÓN, Isabel ; FIGURA, Kurt von: Defective oligomerization of arylsulfatase a as a cause of its instability in lysosomes and metachromatic leukodystrophy. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (2002), März, Nr. 11, S. 9455–61. – ISSN 0021–9258

- [19] CALIAS, Pericles ; PAPISOV, Mikhail ; PAN, Jing ; SAVIOLI, Nancy ; BELOV, Vasily ; HUANG, Yan ; LOTTERHAND, Jason ; ALESSANDRINI, Mary ; LIU, Nan ; FISCHMAN, Alan J. ; POWELL, Jan L. ; HEARTLEIN, Michael W.: CNS penetration of intrathecal-lumbar idursulfase in the monkey, dog and mouse: implications for neurological outcomes of lysosomal storage disorder. In: *PloS one* 7 (2012), Januar, Nr. 1, S. e30341. – ISSN 1932–6203
- [20] CESANI, Martina ; CAPOTONDO, Alessia ; PLATI, Tiziana ; SERGI, Lucia S. ; FUMAGALLI, Francesca ; RONCAROLO, Maria G. ; NALDINI, Luigi ; COMI, Giancarlo ; SESSA, Maria ; BIFFI, Alessandra: Characterization of new arylsulfatase A gene mutations reinforces genotype-phenotype correlation in metachromatic leukodystrophy. In: *Human mutation* 30 (2009), Oktober, Nr. 10, S. E936–45. – ISSN 1098–1004
- [21] CHANG, Michael ; COOPER, Jonathan D. ; SLEAT, David E. ; CHENG, Seng H. ; DODGE, James C. ; PASSINI, Marco a. ; LOBEL, Peter ; DAVIDSON, Beverly L.: Intraventricular enzyme replacement improves disease phenotypes in a mouse model of late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 16 (2008), April, Nr. 4, S. 649–56. – ISSN 1525–0024
- [22] CHAO, Hanna Huey-jiun ; WAHEED, Abdul ; POHLMANN, Regina ; HILLE, Annette ; FIGURA, Kurt V.: Mannose 6-phosphate receptor dependent secretion of. In: *The EMBO Journal* 9 (1990), Nr. 1, S. 3507–3513
- [23] CHEN, Ying ; BALASUBRAMANIAN, Veerakumar ; PENG, Jie ; HURLOCK, Edward C. ; TALLQUIST, Michelle ; LI, Jianrong ; LU, Q R.: Isolation and culture of rat and mouse oligodendrocyte precursor cells. In: *Nature protocols* 2 (2007), Januar, Nr. 5, S. 1044–51. – ISSN 1750–2799
- [24] COSTELLO, Daniel J. ; EICHLER, April F. ; EICHLER, Florian S.: Leukodystrophies: classification, diagnosis, and treatment. In: *The neurologist* 15 (2009), Nr. 6, S. 319–28. – ISSN 10747931
- [25] DAVID A. WENGER, MARTHA SATTLER, Cameron C. ; CANDACE ; STOLINEKY, B .F .: I-Cell Disease : Activities of lysosomal enzymes toward natural and synthetic substrates. In: *Life Sciences* 19 (1976), Nr. 1, S. 413–420
- [26] DHAMI, Rajwinder ; SCHUCHMAN, Edward H.: Mannose 6-phosphate receptor-mediated uptake is defective in acid sphingomyelinase-deficient macrophages: implications for Niemann-Pick disease enzyme replacement therapy. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (2004), Januar, Nr. 2, S. 1526–32. – ISSN 0021–9258
- [27] DI NATALE, P. ; VANACORE, B. ; DANIELE, A. ; ESPOSITO, S.: Heparan N-sulfatase: in vitro mutagenesis of potential N-glycosylation sites. In: *Biochemical and biophysical research communications* 280 (2001), Februar, Nr. 5, S. 1251–7. – ISSN 0006–291X
- [28] DICKSON, P I.: Novel treatments and future perspectives: outcomes of intrathecal drug delivery. In: *International journal of clinical pharmacology and therapeutics* 47 Suppl 1 (2009), S. S124–S127
- [29] DIERENFELD A.D. , MCENTEE M.F. , VOGLER C.A., VITE C.H., CHEN A. H., Passage M. ; LE SHAH, S. ; JENS, J K. ; SNELLA, E M. ; KLINE, K L. ; PARKES, J D. ; WARE, W A. ; MORAN, L E.: Replacing the Enzyme  $\alpha$ -L-Iduronidase at Birth Ameliorates Symptoms in the Brain and Periphery of Dogs with Mucopolysaccharidosis Type I. 2 (2011), Nr. 60, S. 1–18
- [30] DIMENT, S ; DEAN, M F.: Receptor-mediated endocytosis of fibroblast beta-glucuronidase by peritoneal macrophages. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 762 (1983), Nr. 2, S. 165–174
- [31] DITTMER, F ; ULBRICH, E J. ; HAFNER, A ; SCHMAHL, W ; MEISTER, T ; POHLMANN, R ; FIGURA, K von: Alternative mechanisms for trafficking of lysosomal enzymes in mannose 6-phosphate receptor-deficient mice are cell type-specific. In: *Journal of cell science* 112 ( Pt 1 (1999), Mai, S. 1591–7. – ISSN 0021–9533
- [32] DODGE, James C. ; CLARKE, Jennifer ; TRELEAVEN, Christopher M. ; TAKSIR, Tatyana V. ; GRIFFITHS, Denise a. ; YANG, Wendy ; FIDLER, Jonathan a. ; PASSINI, Marco a. ; KAREY, Kenneth P. ; SCHUCHMAN, Edward H. ; CHENG, Seng H. ; SHIHABUDDIN, Lamya S.: Intracerebroventricular infusion of acid sphingomyelinase corrects CNS manifestations in a mouse model of Niemann-Pick A disease. In: *Experimental neurology* 215 (2009), Februar, Nr. 2, S. 349–57. – ISSN 1090–2430
- [33] ECKHARDT, Matthias: The role and metabolism of sulfatide in the nervous system. In: *Molecular neurobiology* 37 (2008), Nr. 2-3, S. 93–103. – ISSN 0893–7648
- [34] E.H., Desnick R. ; SCHUCHMAN: Enzyme Replacement Therapy for Lysosomal Diseases: Lessons from 20 Years of Experience and Remaining Challenges. In: *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 13 (2012), S. 307–335
- [35] FAN, Jian-Qiang: A counterintuitive approach to treat enzyme deficiencies: use of enzyme inhibitors for restoring mutant enzyme activity. In: *Biological chemistry* 389 (2008), Januar, Nr. 1, S. 1–11. – ISSN 1431–6730
- [36] FANTIN, Alessandro ; VIEIRA, Joaquim M. ; GESTRI, Gaia ; DENTI, Laura ; SCHWARZ, Quenten ; PRYKHOZHII, Sergey ; PERI, Francesca ; WILSON, Stephen W. ; RUHRBERG, Christiana: Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. In: *Blood* 116 (2010), August, Nr. 5, S. 829–40. – ISSN 1528–0020
- [37] FERLINZ, K ; HURWITZ, R ; MOCZALL, H ; LANSMANN, S ; SCHUCHMAN, E H. ; SANDHOFF, K: Functional characterization of the N-glycosylation sites of human acid sphingomyelinase by site-directed mutagenesis. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 243 (1997), Januar, Nr. 1-2, S. 511–7. – ISSN 0014–2956
- [38] FLUHARTY, Arvan L. ; PAGON ROBERTA , ADAM MARGARET, BIRD THOMAS, DOLAN CYNTHIA, FONG CHIN-TO, Stephens K. (Hrsg.): *GeneReviews*. E-Book ; E. Seattle, WA : University of Washington, 2011

- [39] FRATANTONI, J.C. ; HALL, C.W. ; NEUFELD, E.F.: Hurler and Hunter syndromes: mutual correction of the defect in cultured fibroblasts. In: *Science* 162 (1968), Nr. 853, S. 570–572
- [40] FUTERMAN, AH; VAN MEER, Gerrit: The cell biology of lysosomal storage disorders. In: *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5 (2004), Nr. July, S. 554–565. – ISSN 1471–0072
- [41] G.D. VLADUTIU, M.C. R.: Abnormal lysosomal hydrolases excreted by cultured fibroblasts in I-cell disease (Mucopolipidosis II). In: *Biochemical and biophysical research communications* 67 (1975), Nr. 3, S. 956–964
- [42] GIESELMANN, V ; FRANKEN, S ; KLEIN, D ; MANSSON, J E. ; SANDHOFF, R ; LÜLLMANN RAUCH, R ; HARTMANN, D ; SARAVANAN, V P.M. ; DE DEYN, P.P. ; D'HOOGHE, R ; VAN DER LINDEN, A M. ; SCHAEEREN-WIEMERS, N: Metachromatic leukodystrophy: consequences of sulphatide accumulation. In: *Acta paediatrica Supplementum* 92 (2003), Nr. 443, S. 74–79; discussion 45
- [43] GOUGH, P.J. ; GORDON, S: The role of scavenger receptors in the innate immune system. In: *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2 (2000), März, Nr. 3, S. 305–11. – ISSN 1286–4579
- [44] HANS ANDERSSON, PAIGE KAPLAN, KATHERINE KACENA, John Y.: Eight-year clinical outcomes of long-term enzyme replacement therapy for 884 children with Gaucher disease type 1. In: *Pediatrics* 122 (2008), Nr. 6, S. 1182–1190
- [45] HASLEKÅ S, Camilla ; BREEN, Kamilla ; PEDERSEN, Ketil W. ; JOHANNESSEN, Lene E. ; STANG, Espen ; MADSHUS, Inger H.: The Inhibitory Effect of ErbB2 on Epidermal Growth Factor-induced Formation of Clathrin-coated Pits Correlates with Retention of Epidermal Growth Factor Receptor  $\alpha$ “ ErbB2 Oligomeric Complexes at the Plasma Membrane. In: *Molecular Biologie of the Cell* 16 (2005), Nr. December, S. 5832–5842
- [46] HESS, B ; SAFTIG, P ; HARTMANN, D ; COENEN, R ; LÜLLMANN-RAUCH, R ; GOEBEL, H H. ; EVERS, M ; FIGURA, K von ; D'HOOGHE, R ; NAGELS, G ; DE DEYN, P ; PETERS, C ; GIESELMANN, V: Phenotype of arylsulfatase A-deficient mice: relationship to human metachromatic leukodystrophy. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (1996), Dezember, Nr. 25, S. 14821–6. – ISSN 0027–8424
- [47] HIGUCHI, Takashi ; SHIMIZU, Hiromi ; FUKUDA, Takahiro ; KAWAGOE, Shiho ; MATSUMOTO, Juri ; SHIMADA, Yohta ; KOBAYASHI, Hiroshi ; IDA, Hiroyuki ; OHASHI, Toya ; MORIMOTO, Hideto ; HIRATO, Tohru ; NISHINO, Katsuya ; ETO, Yoshikatsu: Enzyme replacement therapy (ERT) procedure for mucopolysaccharidosis type II (MPS II) by intraventricular administration (IVA) in murine MPS II. In: *Molecular genetics and metabolism* 107 (2012), September, Nr. 1-2, S. 122–8. – ISSN 1096–7206
- [48] JALANKO, Anu ; BRAULKE, Thomas: Neuronal ceroid lipofuscinoses. In: *Biochimica et biophysica acta* 1793 (2009), April, Nr. 4, S. 697–709. – ISSN 0006–3002
- [49] JENKINS, H G. ; MARTIN, J ; DEAN, M F.: Receptor-mediated uptake of beta-glucuronidase into primary astrocytes and C6 glioma cells from rat brain. In: *Brain research* 462 (1988), Oktober, Nr. 2, S. 265–74. – ISSN 0006–8993
- [50] JIANG, Liqin ; LI, Xuemin ; LIU, Lingrong ; ZHANG, Qiqing: Cellular uptake mechanism and intracellular fate of hydrophobically modified pullulan nanoparticles. In: *International journal of nanomedicine* 8 (2013), Januar, S. 1825–34. – ISSN 1178–2013
- [51] JOUBERT, Lara ; FOUCAULT, Isabelle ; SAGOT, Yves ; BERNASCONI, Lilia ; DUVAL, François ; ALLIOD, Chantal ; FROSSARD, Marie-José ; PESCHINI GOBERT, Rosanna ; CURCHOD, Marie-Laure ; SALVAT, Catherine ; NICHOLS, Anthony ; POULY, Sandrine ; ROMMEL, Christian ; ROACH, Arthur ; HOOFT VAN HUIJSDUIJNEN, Rob: Chemical inducers and transcriptional markers of oligodendrocyte differentiation. In: *Journal of neuroscience research* 88 (2010), September, Nr. 12, S. 2546–57. – ISSN 1097–4547
- [52] JUNG, M ; KRÄMER, E ; GRZENKOWSKI, M ; TANG, K ; BLAKEMORE, W ; AGUZZI, A ; KHAZAIE, K ; CHLICHIA, K ; VON BLANKENFELD, G ; KETTENMANN, H: Lines of murine oligodendroglial precursor cells immortalized by an activated neu tyrosine kinase show distinct degrees of interaction with axons in vitro and in vivo. In: *European Journal of Neuroscience* 7 (1995), Nr. 6, S. 1245–1265
- [53] JUNGALWALA, F B.: Synthesis and turnover of cerebroside sulfate of myelin in adult and developing rat brain. In: *Journal of lipid research* 15 (1974), März, Nr. 2, S. 114–23. – ISSN 0022–2275
- [54] KAPAUN, P ; DITTMANN, R W. ; GRANITZNY, B ; EICKHOFF, W ; WULBRAND, H ; NEUMAIER-PROBST, E ; ZANDER, A ; KOHL-SCHÜETTER, A: *Stabilization of juvenile metachromatic leukodystrophy after bone marrow transplantation: a 13-year follow-up.* 2007
- [55] KELER, Tibor ; RAMAKRISHNA, Venky ; FANGER, Michael W.: Mannose receptor-targeted vaccines. In: *Expert opinion on biological therapy* 4 (2004), Dezember, Nr. 12, S. 1953–62. – ISSN 1744–7682
- [56] KLEIN, Diana ; YAGHOOTFAM, Afshin ; MATZNER, Ullrich ; KOCH, Bettina ; BRAULKE, Thomas ; GIESELMANN, Volkmar: Mannose 6-phosphate receptor-dependent endocytosis of lysosomal enzymes is increased in sulfatide-storing kidney cells. In: *Biological Chemistry* 390 (2009), Nr. 1, S. 41–48
- [57] KOLTER, Thomas ; SANDHOFF, Konrad: Principles of lysosomal membrane digestion: stimulation of sphingolipid degradation by sphingolipid activator proteins and anionic lysosomal lipids. In: *Annual review of cell and developmental biology* 21 (2005), Januar, S. 81–103. – ISSN 1081–0706
- [58] KÖSTER A., von Figura K. ; R., Pohlmann: Mistargeting of lysosomal enzymes in M, 46000 mannose 6-phosphate receptor-deficient mice is compensated by carbohydrate-specific endocytotic receptors. In: *Eur. J. Biochem.* 224, 685–689 (1994) 689 (1994), S. 685–689

- [59] KREYSING, J ; FIGURA, K von ; GIESELMANN, V: Structure of the arylsulfatase A gene. In: *European journal of biochemistry / FEBS* 191 (1990), August, Nr. 3, S. 627–31. – ISSN 0014–2956
- [60] KUDO, Mariko ; BREM, Michael S. ; CANFIELD, William M.: Mucopolipidosis II (I-cell disease) and mucopolipidosis IIIA (classical pseudo-hurler polydystrophy) are caused by mutations in the GlcNAc-phosphotransferase alpha / beta -subunits precursor gene. In: *American journal of human genetics* 78 (2006), März, Nr. 3, S. 451–63. – ISSN 0002–9297
- [61] LACHMANN, Robin H.: Substrate reduction therapy for lysosomal storage diseases. In: *Drugs of today Barcelona Spain 1998 94* (2006), Nr. 1, S. 29–38
- [62] LAI, Joey ; BERNHARD, Oliver K. ; TURVILLE, Stuart G. ; HARMAN, Andrew N. ; WILKINSON, John ; CUNNINGHAM, Anthony L.: Oligomerization of the macrophage mannose receptor enhances gp120-mediated binding of HIV-1. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (2009), April, Nr. 17, S. 11027–38. – ISSN 0021–9258
- [63] LASSMANN, H ; ZIMPRICH, F ; VASS, K ; HICKEY, W F.: Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans. In: *Journal of Neuroscience Research* 28 (1991), Nr. 2, S. 236–243. – ISSN 03604012
- [64] LEE, Wing C. ; TSOI, Yuen K. ; TROENDLE, Frederick J. ; DELUCIA, Michael W. ; AHMED, Zeshan ; DICKY, Chad a. ; DICKSON, Dennis W. ; ECKMAN, Christopher B.: Single-dose intracerebroventricular administration of galactocerebrosidase improves survival in a mouse model of globoid cell leukodystrophy. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21 (2007), August, Nr. 10, S. 2520–7. – ISSN 1530–6860
- [65] LEROY, Toon ; STROOBANTS, Stijn ; AERTS, Jean-Marie ; D’HOOGE, Rudi ; BERCKMANS, Daniel: Automatic analysis of altered gait in arylsulphatase A-deficient mice in the open field. In: *Behavior research methods* 41 (2009), August, Nr. 3, S. 787–94. – ISSN 1554–351X
- [66] LINDO, L ; IBORRA, F J. ; AZORIN, I ; GUERRI, C ; RENAUI-PIQUERAS, J: Analysis of the endocytic-lysosomal system (vacuolar apparatus) in astrocytes during proliferation and differentiation in primary culture. In: *The International journal of developmental biology* 37 (1993), Dezember, Nr. 4, S. 565–72. – ISSN 0214–6282
- [67] LOUIS, J C. ; MAGAL, E ; MUIR, D ; MANTHORPE, M ; VARON, S: CG-4, a new bipotential glial cell line from rat brain, is capable of differentiating in vitro into either mature oligodendrocytes or type-2 astrocytes. In: *Journal of neuroscience research* 31 (1992), Januar, Nr. 1, S. 193–204. – ISSN 0360–4012
- [68] LU, Q R. ; YUK, D ; ALBERTA, J A. ; ZHU, Z ; PAWLITZKY, I ; CHAN, J ; MCMAHON, A P. ; STILES, C D. ; ROWITCH, D H.: Sonic hedgehog-regulated oligodendrocyte lineage genes encoding bHLH proteins in the mammalian central nervous system. In: *Neuron* 25 (2000), Nr. 2, S. 317–329
- [69] LÜLLMANN-RAUCH, Renate: *Taschenlehrbuch Histologie*. 2. Auflage. Thieme, 2006
- [70] MARTINO, Sabata ; EMILIANI, Carla ; TANCINI, Brunella ; SEVERINI, Giovanni M. ; CHIGORNO, Vanna ; BORDIGNON, Claudio ; SONNINO, Sandro ; ORLACCHIO, Aldo: Absence of metabolic cross-correction in Tay-Sachs cells: implications for gene therapy. In: *The Journal of Biological Chemistry* 277 (2002), Nr. 23, S. 20177–20184
- [71] MATTHES, Frank: Enzyersatztherapie der metachromatischen Leukodystrophie: Untersuchungen zur therapeutischen Wirksamkeit rekombinanter humaner Arylsulfatase A und zum transendothelialen Übertritt über die Blut-Hirn-Schranke. In: *Dissertation* (2010)
- [72] MATTHES, Frank ; STROOBANTS, Stijn ; GERLACH, Debora ; WOHLBERG, Claudia ; WESSIG, Carsten ; FOGH, Jens ; GIESELMANN, Volkmar ; ECKHARDT, Matthias ; D’HOOGE, Rudi ; MATZNER, Ulrich: Efficacy of enzyme replacement therapy in an aggravated mouse model of metachromatic leukodystrophy declines with age. In: *Human molecular genetics* 21 (2012), Juni, Nr. 11, S. 2599–609. – ISSN 1460–2083
- [73] MATTHES, Frank ; WÖLTE, Philipp ; BÖCKENHOFF, Annika ; HÜWEL, Sabine ; SCHULZ, Mareike ; HYDEN, Pia ; FOGH, Jens ; GIESELMANN, Volkmar ; GALLA, Hans-Joachim ; MATZNER, Ulrich: Transport of arylsulfatase A across the blood-brain barrier in vitro. In: *The Journal of Biological Chemistry* 275 (2000), Nr. 20, S. 40252–40257
- [74] MATZNER, U ; HARZER, K ; LEARISH, R D. ; BARRANGER, J a. ; GIESELMANN, V: Long-term expression and transfer of arylsulfatase A into brain of arylsulfatase A-deficient mice transplanted with bone marrow expressing the arylsulfatase A cDNA from a retroviral vector. In: *Gene therapy* 7 (2000), Juli, Nr. 14, S. 1250–7. – ISSN 0969–7128
- [75] MATZNER, Ullrich ; HABETHA, M ; GIESELMANN, Volkmar: Retrovirally expressed human arylsulfatase A corrects the metabolic defect of arylsulfatase A-deficient mouse cells. In: *Gene therapy* 7 (2000), Mai, Nr. 9, S. 805–12. – ISSN 0969–7128
- [76] MATZNER, Ulrich ; GIESELMANN, Volkmar: Gene therapy of metachromatic leukodystrophy. In: *Expert opinion on biological therapy* 5 (2005), Januar, Nr. 1, S. 55–65. – ISSN 1744–7682
- [77] MATZNER, Ulrich ; HERBST, Eva ; HEDAYATI, Kerstin K. ; LÜLLMANN-RAUCH, Renate ; WESSIG, Carsten ; SCHRÖDER, Stephan ; EISTRUP, Carl ; MÖLLER, Christer ; FOGH, Jens ; GIESELMANN, Volkmar: Enzyme replacement improves nervous system pathology and function in a mouse model for metachromatic leukodystrophy. In: *Human molecular genetics* 14 (2005), Mai, Nr. 9, S. 1139–52. – ISSN 0964–6906

- [78] MATZNER, Ulrich ; LÜLLMANN-RAUCH, Renate ; STROOBANTS, Stijn ; ANDERSSON, Claes ; WEIGELT, Cecilia ; EISTRUP, Carl ; FOGH, Jens ; D'HOOGHE, Rudi ; GIESELMANN, Volkmar: Enzyme replacement improves ataxic gait and central nervous system histopathology in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. In: *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 17 (2009), April, Nr. 4, S. 600–6. – ISSN 1525–0024
- [79] MATZNER, Ulrich ; MATTHES, Frank ; HERBST, Eva ; LÜLLMANN-RAUCH, Renate ; CALLAERTS-VEGH, Zsuzsanna: Induction of Tolerance to Human Arylsulfatase A in a Mouse Model of Metachromatic Leukodystrophy. In: *Online* 3 (2007), S. 1–9
- [80] MATZNER, Ulrich ; MATTHES, Frank ; WEIGELT, Cecilia ; ANDERSSON, Claes ; EISTRUP, Carl ; FOGH, Jens ; GIESELMANN, Volkmar: Non-inhibitory antibodies impede lysosomal storage reduction during enzyme replacement therapy of a lysosomal storage disease. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 86 (2008), April, Nr. 4, S. 433–42. – ISSN 0946–2716
- [81] MEGIAS, L ; GUERRI, C ; FORNAS, E ; AZORIN, I ; BENDALA, E ; SANCHO-TELLO, M ; DURÁN, J M. ; TOMÁS, M ; GOMEZ-LECHON, M J. ; RENAU-PIQUERAS, J: Endocytosis and transcytosis in growing astrocytes in primary culture. Possible implications in neural development. In: *The International journal of developmental biology* 44 (2000), Februar, Nr. 2, S. 209–21. – ISSN 0214–6282
- [82] MOSLEY, Jonathan D. ; POIRIER, John T. ; SEACHRIST, Darcie D. ; LANDIS, Melissa D. ; KERI, Ruth a.: Rapamycin inhibits multiple stages of c-Neu/ErbB2 induced tumor progression in a transgenic mouse model of HER2-positive breast cancer. In: *Molecular cancer therapeutics* 6 (2007), August, Nr. 8, S. 2188–97. – ISSN 1535–7163
- [83] MUSCHOL, Nicole ; MATZNER, Ulrich ; TIEDE, Stephan ; GIESELMANN, Volkmar ; ULLRICH, Kurt ; BRAULKE, Thomas: from isolated human macrophages. In: *Society* 853 (2002), S. 845–853
- [84] NAVARRO, C ; FERNÁNDEZ, J M. ; DOMÍNGUEZ, C ; FACHAL, C ; ALVAREZ, M: *Late juvenile metachromatic leukodystrophy treated with bone marrow transplantation; a 4-year follow-up study.* 1996
- [85] NEAL J WEINREB, JOEL CHARROW, HANS C ANDERSSON, PAIGE KAPLAN, EDWIN H KOLODNY, PRAMOD MISTRY, GREGORY PASTORES, BARRY E ROSENBLUM, C RONALD SCOTT, REBECCA S WAPPNER, Ari Z.: Effectiveness of enzyme replacement therapy in 1028 patients with type 1 Gaucher disease after 2 to 5 years of treatment: a report from the Gaucher Registry. In: *The American journal of medicine* 113 (2002), S. 112–119
- [86] NEUFELD, EF: Replacement of genotype-specific proteins in mucopolysaccharidoses. In: *Birth Defects Orig Artic Ser.* 2 (1973), S. 27–30.
- [87] NEUMANN, Harald: Microglia : a cellular vehicle for CNS gene therapy. In: *In Vivo* 116 (2006), Nr. 11
- [88] NORFLUS, F ; TIFFT, C J. ; McDONALD, M P. ; GOLDSTEIN, G ; CRAWLEY, J N. ; HOFFMANN, A ; SANDHOFF, K ; SUZUKI, K ; PROIA, R L.: Bone marrow transplantation prolongs life span and ameliorates neurologic manifestations in Sandhoff disease mice. In: *The Journal of clinical investigation* 101 (1998), Mai, Nr. 9, S. 1881–8. – ISSN 0021–9738
- [89] NORTON, W T. ; PODUSLO, S E.: Biochemical studies of metachromatic leukodystrophy in three siblings. In: *Acta neuropathologica* 57 (1982), Januar, Nr. 2-3, S. 188–96. – ISSN 0001–6322
- [90] PARDRIDGE, William M.: Drug targeting to the brain. In: *Pharmaceutical research* 24 (2007), September, Nr. 9, S. 1733–44. – ISBN 1109500793
- [91] PATEL, N K. ; GILL, S S.: GDNF delivery for Parkinson's disease. In: *Acta Neurochirurgica Supplement* 97 (2007), Nr. Pt 2, S. 135–154
- [92] PAXINOS GEORGE, Franklin Keith B. J.: *Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press, 2001
- [93] PLATT, Frances M. ; LACHMANN, Robin H.: Treating lysosomal storage disorders: current practice and future prospects. In: *Biochimica et biophysica acta* 1793 (2009), April, Nr. 4, S. 737–45. – ISSN 0006–3002
- [94] POHL, Sandra ; MARSCHNER, Katrin ; STORCH, Stephan ; BRAULKE, Thomas: Glycosylation- and phosphorylation-dependent intracellular transport of lysosomal hydrolases. In: *Biological chemistry* 390 (2009), Juli, Nr. 7, S. 521–7. – ISSN 1431–6730
- [95] POLTEN, A ; FLUHARTY, A L. ; FLUHARTY, C B. ; KAPPLER, J ; VON FIGURA, K ; GIESELMANN, V: Molecular basis of different forms of metachromatic leukodystrophy. In: *The New England Journal of Medicine* 324 (1991), Nr. 1, S. 18–22
- [96] PORTER, M T. ; FLUHARTY, A L. ; KIHARA, H: Correction of abnormal cerebroside sulfate metabolism in cultured metachromatic leukodystrophy fibroblasts. In: *Science* 172 (1971), Nr. 989, S. 1263–1265
- [97] PRYOR, Paul R. ; LUZIO, J P.: Delivery of endocytosed membrane proteins to the lysosome. In: *Biochimica et biophysica acta* 1793 (2009), April, Nr. 4, S. 615–24. – ISSN 0006–3002
- [98] RAFF, M C. ; MILLER, R H. ; NOBLE, M: A glial progenitor cell that develops in vitro into an astrocyte or an oligodendrocyte depending on culture medium. In: *Nature* 303 (1983), Nr. 5916, S. 390–396
- [99] RAMAKRISHNAN, Hariharasubramanian ; HEDAYATI, Kerstin K. ; LÜLLMANN-RAUCH, Renate ; WESSIG, Carsten ; FEWOU, Simon N. ; MAIER, Helena ; GOEBEL, Hans-Hilmar ; GIESELMANN, Volkmar ; ECKHARDT, Matthias: Increasing sulfatide synthesis in myelin-forming cells of arylsulfatase A-deficient mice causes demyelination and neurological symptoms reminiscent of human metachromatic leukodystrophy. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27 (2007), August, Nr. 35, S. 9482–90. – ISSN 1529–2401

- [100] RANSOHOFF, Richard M. ; CARDONA, Astrid E.: The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. In: *Nature* 468 (2010), November, Nr. 7321, S. 253–62. – ISSN 1476–4687
- [101] REIBER, H ; BRIGITTE WILDEMAN, PATRICK OSCHMANN, Hansotto R. (Hrsg.): *A.4 Blut-Liquor-Schrankenfunktion und Liquorfluß*. 2006. – 58–60 S.
- [102] RICHARDSON, William D. ; YOUNG, Kaylene M. ; TRIPATHI, Richa B. ; MCKENZIE, Ian: NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy? In: *Neuron* 70 (2011), Mai, Nr. 4, S. 661–73. – ISSN 1097–4199
- [103] RISAU, Werner ; ENGELHARDT, Britta: Immune Function of the Blood-Brain Barrier :. 110 (1990), Nr. May, S. 1757–1766
- [104] SAHAGIAN, G G. ; DISTLER, J ; JOURDIAN, G W.: Characterization of a membrane-associated receptor from bovine liver that binds phosphomannosyl residues of bovine testicular beta-galactosidase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78 (1981), Juli, Nr. 7, S. 4289–93. – ISSN 0027–8424
- [105] SAMBROOK J., FRITSCH E. F., MANIATIS, T.: *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Sprin. 1989
- [106] SANGALLI, Antonella ; TAVEGGIA, Carla ; SALVIATI, Alessandro ; WRABETZ, L A W R E N C E. ; BORDIGNON, Claudio ; SEVERINI, Giovanni M.: Transduced fibroblasts and metachromatic leukodystrophy lymphocytes transfer arylsulfatase A to myelinating glia and deficient cells in vitro. In: *Human Gene Therapy* 2119 (1998), S. 2111–2119
- [107] SCHLUFF, P ; FLOTT-RAHME, B ; GIESELMANN, V ; ZIMMER, P ; DAS, A ; ULLRICH, K: Localization of receptors for endocytosis of lysosomal enzymes on different brain cells. In: *Journal of inherited metabolic disease* 21 (1998), Juni, Nr. 3, S. 313–7. – ISSN 0141–8955
- [108] SCHRÖDER, Stephan ; MATTHES, Frank ; HYDEN, Pia ; ANDERSSON, Claes ; FOGH, Jens ; MÜLLER-LOENNIES, Sven ; BRAULKE, Thomas ; GIESELMANN, Volkmar ; MATZNER, Ulrich: Site-specific analysis of N-linked oligosaccharides of recombinant lysosomal arylsulfatase A produced in different cell lines. In: *Glycobiology* 20 (2010), Februar, Nr. 2, S. 248–59. – ISSN 1460–2423
- [109] SCHULTZ, Mark L. ; TECEDOR, Luis ; CHANG, Michael ; DAVIDSON, Beverly L.: Clarifying lysosomal storage diseases. In: *Trends in Neurosciences* 34 (2011), Nr. 8, S. 401–410
- [110] SCOTT, J E. ; DORLING, J: Differential Staining of Acid Glycosaminoglycans (Mucopolysaccharides) by Alcian Blue in Salt Solutions. In: *Histochemie* 5, 221–233 (1965) 233 (1965), S. 221–233
- [111] SHIRE HUMAN GENETIC THERAPIES, Inc.: *Multicenter Study of HGT-1110 Administered Intrathecally in Children With Metachromatic Leukodystrophy (MLD) (IDEAMLD)*. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01510028>. Version: 2012
- [112] SMITH, Howard S. ; DEER, Timothy R. ; STAATS, Peter S. ; SINGH, Vijay ; SEHGAL, Nalini ; CORDNER, Harold: Intrathecal drug delivery. In: *Pain Physician* 11 (2008), Nr. 2 Suppl, S. S89–S104
- [113] SMITH, Nicholas J. ; MARCUS, Robert E. ; SAHAKIAN, Barbara J. ; KAPUR, Narinder ; COX, Timothy M.: Haematopoietic stem cell transplantation does not retard disease progression in the psycho-cognitive variant of late-onset metachromatic leukodystrophy. In: *Journal of Inherited Metabolic Disease* 33 (2010), Nr. 3, S. 471–475
- [114] SOLINAS-TOLDO, S ; DÜRST, M ; LICHTER, P: Specific chromosomal imbalances in human papillomavirus-transfected cells during progression toward immortality. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (1997), April, Nr. 8, S. 3854–9. – ISSN 0027–8424
- [115] SOMMERLADE, H J. ; SELMER, T ; INGENDO, A ; GIESELMANN, V ; FIGURA, K von ; NEIFER, K ; SCHMIDT, B: Glycosylation and phosphorylation of arylsulfatase A. In: *The Journal of biological chemistry* 269 (1994), August, Nr. 33, S. 20977–81. – ISSN 0021–9258
- [116] STEIN, C ; GIESELMANN, V ; KREYSING, J ; SCHMIDT, B ; POHLMANN, R ; WAHEED, A ; MEYER, H E. ; O'BRIEN, J S. ; FIGURA, K von: Cloning and expression of human arylsulfatase A. In: *The Journal of biological chemistry* 264 (1989), Januar, Nr. 2, S. 1252–9. – ISSN 0021–9258
- [117] STROOBANTS, Stijn ; GERLACH, Debora ; MATTHES, Frank ; HARTMANN, Dieter ; FOGH, Jens ; GIESELMANN, Volkmar ; D'HOOGHE, Rudi ; MATZNER, Ulrich: Intracerebroventricular enzyme infusion corrects central nervous system pathology and dysfunction in a mouse model of metachromatic leukodystrophy. In: *Human molecular genetics* 20 (2011), Juli, Nr. 14, S. 2760–9. – ISSN 1460–2083
- [118] STROOBANTS, Stijn ; LEROY, Toon ; ECKHARDT, Matthias ; AERTS, Jean-Marie ; BERCKMANS, Daniel ; D'HOOGHE, Rudi: Early signs of neuropiloidosis-related behavioural alterations in a murine model of metachromatic leukodystrophy. In: *Behavioural brain research* 189 (2008), Juni, Nr. 2, S. 306–16. – ISSN 0166–4328
- [119] SUN, Ying ; WITTE, David P. ; RAN, Huimin ; ZAMZOW, Matt ; BARNES, Sonya ; CHENG, Hua ; HAN, Xianlin ; WILLIAMS, Michael T. ; SKELTON, Matthew R. ; VORHEES, Charles V. ; GRABOWSKI, Gregory a.: Neurological deficits and glycosphingolipid accumulation in saposin B deficient mice. In: *Human molecular genetics* 17 (2008), August, Nr. 15, S. 2345–56. – ISSN 1460–2083
- [120] TAKAHASHI, Tadanobu ; SUZUKI, Takashi: Role of sulfatide in normal and pathological cells and tissues. In: *Journal of lipid research* 53 (2012), August, Nr. 8, S. 1437–50. – ISSN 0022–2275

- [121] THEEUWES, F ; SWANSON, D ; WONG, P ; BONSEN, P ; PLACE, V ; HEIMLICH, K ; KWAN, K C.: Elementary osmotic pump for indomethacin. In: *Journal of pharmaceutical sciences* 72 (1975), März, Nr. 3, S. 253–8. – ISSN 0022–3549
- [122] THEEUWES F. AND YUM S.I.: *Principles of Design and Operation of Generic Osmotic Pumps for Delivery of Semisolid or Liquid Drug Formulations*. Theewes1976, 1976
- [123] TSUBAMOTO, Y ; YAMADA, N ; WATANABE, Y ; INABA, T ; SHIOMI, M ; SHIMANO, H ; GOTODA, T ; HARADA, K ; SHIMADA, M ; OHSUGA, J: Dextran sulfate, a competitive inhibitor for scavenger receptor, prevents the progression of atherosclerosis in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. In: *Atherosclerosis* 106 (1994), März, Nr. 1, S. 43–50. – ISSN 0021–9150
- [124] WADA, R ; TIFFT, C J. ; PROIA, R L.: Microglial activation precedes acute neurodegeneration in Sandhoff disease and is suppressed by bone marrow transplantation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (2000), September, Nr. 20, S. 10954–9. – ISSN 0027–8424
- [125] WADA, Y ; DOI, T ; MATSUMOTO, A ; ASAOKA, H ; HONDA, M ; HATANO, H ; EMI, M ; NAITO, M ; MORI, T ; TAKAHASHI, K ; NAKAMURA, H ; ITAKURA, H ; YAZAKI, Y ; KODAMA, T: *Structure and function of type I and II macrophage scavenger receptors*. 1995
- [126] WESTABY, S.: Circulatory Support for Long-Term Treatment of Heart Failure: Experience With an Intraventricular Continuous Flow Pump. In: *Circulation* 105 (2002), Mai, Nr. 22, S. 2588–2591. – ISSN 00097322
- [127] WHELAN, Fiona J. ; MEEHAN, Conor J. ; GOLDING, G B. ; MCCONKEY, Brendan J. ; BOWDISH, Dawn M E.: The evolution of the class A scavenger receptors. In: *BMC evolutionary biology* 12 (2012), Januar, S. 227. – ISSN 1471–2148
- [128] WITTKÉ, D ; HARTMANN, D ; GIESELMANN, V ; LÜLLMANN-RAUCH, R: Lysosomal sulfatide storage in the brain of arylsulfatase A-deficient mice: cellular alterations and topographic distribution. In: *Acta neuropathologica* 108 (2004), Oktober, Nr. 4, S. 261–71. – ISSN 0001–6322
- [129] WOLF, H K. ; BUSLEI, R ; SCHMIDT-KASTNER, R ; SCHMIDT-KASTNER, P K. ; PIETSCH, T ; WIESTLER, O D. ; BLÜMCKE, I: NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry official journal of the Histochemistry Society* 44 (1996), Nr. 10, S. 1167–1171
- [130] WUJEK, Peter ; KIDA, Elizabeth ; WALUS, Marius ; WISNIEWSKI, Krystyna E. ; GOLABEK, Adam a.: N-glycosylation is crucial for folding, trafficking, and stability of human tripeptidyl-peptidase I. In: *The Journal of biological chemistry* 279 (2004), März, Nr. 13, S. 12827–39. – ISSN 0021–9258
- [131] ZHANG, S C.: Defining glial cells during CNS development. In: *Nature reviews. Neuroscience* 2 (2001), November, Nr. 11, S. 840–3. – ISSN 1471–003X
- [132] ZIEGLER, Robin J. ; SALEGIO, Ernesto a. ; DODGE, James C. ; BRINGAS, John ; TRELEAVEN, Christopher M. ; BERCURY, Scott D. ; TAMSETT, Thomas J. ; SHIHABUDDIN, Lamyia ; HADACZEK, Piotr ; FIANDACA, Massimo ; BANKIEWICZ, Krystof ; SCHEULE, Ronald K.: Distribution of acid sphingomyelinase in rodent and non-human primate brain after intracerebroventricular infusion. In: *Experimental neurology* 231 (2011), Oktober, Nr. 2, S. 261–71. – ISSN 1090–2430





## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2-Azino-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate(6)] diammonium salt
ASA	Arylsulfatase A
ASSC	<i>active-site-specific-chaperons</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	<i>basic-Fibroblast Growth Factor</i>
BHS	Bluthirnschranke
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CGT	Galaktosyltransferase
CHO-S	<i>Chinese Hamster Ovary -Suspensial</i>
CST	Cerebrosidsulfotransferase
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	<i>double-distilled water</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EET	Enzymersatztherapie
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest)
Endo H	Endoglykosidase H
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
FGE	Formylglycin-generierendes Enzym
G6P	Glukose-6-Phosphat
GalCer	Galaktosylceramid
GLD	Globoid Zell Leukodystrophie
GDNF	glialer, neurotropher Faktor
GlcNAc	N-Acetylglukosamin

hASA	Humane Arylsulfatase A
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HSZ	hämatopoetische Stammzellen
I2S	Iduronat-2-Sulfatase
IHC	Immunhistochemie
IK	Inkongruenzkoeffizient
IZC	Immunzytochemie
i.z.v.	intrazerebroventrikulär
KMT	Knochenmarkstransplantation
KO	Knock-out
LAMP2	<i>Lysosomal-associated membrane protein 2</i>
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LSD	<i>Lysosomal storage diseases</i>
M6P	Mannose-6-Phosphat
mASA	Murine Arylsulfatase A
MBP	<i>Myelin basic protein</i>
MEF	<i>Mouse embryonic fibroblasts</i>
MLD	Metachromatische Leukodystrophie
MPR	Mannose-6-Phosphat-Rezeptor
MPS	Mukopolysaccharidose
SINCL	spät Infantile Neuronale Ceroid-Lipofuszinose
NG2	<i>Neuron-glia antigen 2</i>
OD	Optische Dichte
OVZ	Oligodendrozyten-Vorläuferzellen
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PDGF-AA	<i>Platelet-derived growth factor AA</i>
PDO	Poly-D-Ornithin
PFA	Paraformaldehyd
PLL	Poly-L-Lysin
PLP	Proteolipo-Protein
p-NCS	4-Nitrokatecholsulfat
p-NPAG	4-Nitrophenyl N-acetyl- $\beta$ -D-Glukosaminid
PNS	peripheres Nervensystem
rhASA	Rekombinante humane Arylsulfatase A

---

RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung)
TGK	Trans-Golgi Kompartiment
TPP I	bTripeptidylpeptidase I
UCE	<i>uncovering enzyme</i>
UDP	Uridindiphosphat
üN	über Nacht
Vol.	Volumen
WB	Western Blot
WT	Wild-Typ
ZNS	zentrales Nervensystem
β-Hex	β-Hexosaminidase



## 8 Anhang

### 8.1 Klonierung und Analytik muriner ASA

#### Vektoren zur Klonierung von ASA-Fusionsproteinen

**Tabelle 8.1: Verwendete Vektoren**

Bezeichnung	Beschreibung
pcDNA3	Eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV-Promotor (Invitrogen)
pSPORT6-mASA	Plasmid zur eukaryotischen Expression muriner ASA (ImaGenes, Klon: IRAVp968A0625D)
pJET1.2	Linearisierter Klonierungsvektor (Thermo Scientific)

## Verwendete Primer und Oligonukleotide

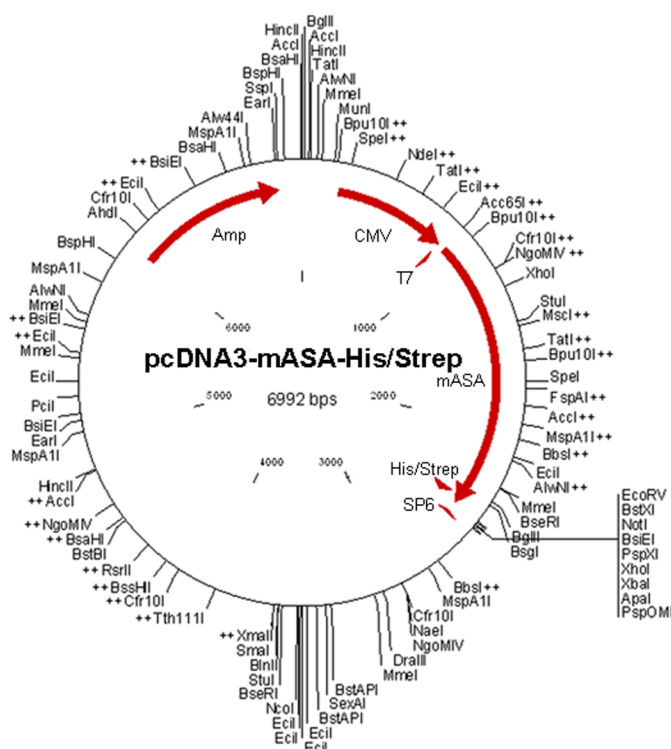
**Tabelle 8.2:** Verwendete Primer für die Klonierung von mASA-Fusionskonstrukten.

Oligonukleotid Base in 5' → 3' Richtung	
5'-Primer His/Strep	CGGGGTACCTGATCATCGCCGTCATGGCCCTGGGGACCCTC
3'-Primer His/Strep	GCCGCTAGCTCAATTGTCACCTTCTCGAACTGAGGGTGGGAC CAATGGTGATGGTGATGGTGGGACTGGGAGCCTGGGCAGTG
5'-Primer 2 x Strep	CGGGGATCCGAATTCTCGCCGTCATGGCCCTGGGGACCCTC
3'-Primer 2 x Strep	AATGGTACCGGACTGGGAGCCTGGGCAGTG
Oligo 5' → 3'	CTCCGCTTGGTCCCACCCTCAGTTCGAGAAGGGCGGTGGTT CCGGCGGTGGTTCCGGTGGATCCGCTTGGTCCCACCCTCAG TTCGAGAAGTGAG
Oligo 3' → 5'	AATTCTCACTTCTCGAACTGAGGGTGGGACCAAGCGGATCC ACCGGAACCACCGCCGGAACCACCGCCCTTCTCGAACTGAG GGTGGGACCAAGCGGAGGTAC

## Klonierung von mASA-His/Strep

Ziel dieser Klonierung war es, mittels PCR die mASA aus dem SPORT-6 Vektor zu amplifizieren, diese mit einem C-Terminalen doppel-Tag, bestehend aus einem His-Tag und einem StrepII-Tag, zu fusionieren und in den pcDNA3-Vektor einzubringen. N-Terminal besitzt die ASA ein ER-Importsignal, deshalb wurde der Tag an den C-Terminus kloniert. Dazu wurden mittels PCR zunächst eine verbesserte Kozak Sequenz, am 5'-Ende eine KpnI- und BclI- und am 3'-Ende eine MfeI- und NheI- Schnittstelle sowie der doppel-Tag eingefügt. Anschließend wurde das PCR Fragment *blunt-end* mit dem pJET1.2 Vektor ligiert um die Restriktion zu erleichtern. Geschnitten wurde das Konstrukt mit BclI und MfeI. Der pcDNA3-Vektor wurde mit BamHI (kompatibel mit BclI) und EcoRI (kompatibel mit MfeI) geschnitten. Nach Ligation bildeten die kompatiblen, nicht identischen Schnittstellen eine nicht schneidbare Sequenz wodurch eine negative Selektion von Religanden möglich war. Zur Herstellung großer Mengen von mASA-His/Strep wurde das Klonierungsprodukt in CHO-S-Zellen exprimiert.

A



B



Abbildung 8.1: Vektorkarte des pcDNA3-mASA-His/Strep Plasmids und die schematische Darstellung des mASA-His/Strep-Konstruktes.

A: Vektorkarte des pcDNA3-mASA-His/Strep. B: Schematische Darstellung des mASA-His/Strep-Konstruktes mit Schnittstellen.

In Abb 8.1 ist das daraus resultierende Plasmid sowie eine schematische Darstellung des Fusionskonstruktes mASA-His/Strep gezeigt.

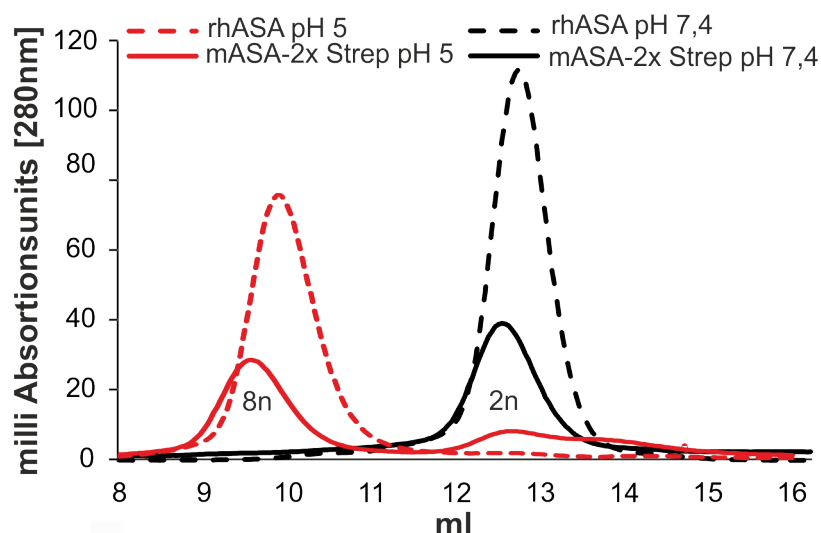
## Klonierung von mASA-2 x Strep

Hergestellt werden sollte eine mASA mit C-Terminalem doppel-StrepII-Tag. Über eine PCR wurde das mASA Fragment aus dem SPORT-6-mASA Vektor mittels dem 5'- und 3'- Primer (siehe Tab. 8.2) amplifiziert. Dabei wurden neben einer verbesserten Kozaksequenz am 5'-Ende eine BamHI- und EcoRI-Schnittstelle eingeführt. Durch die gewählten Primer wurde am 3'-Ende zusätzlich eine KpnI-Schnittstelle eingeführt. Nach Amplifikation erfolgte eine Ligation mit den pJET1.2 Vektor. Die anschließende Restriktion erfolgte mit BamHI und KpnI. Der Zielvektor (pcDNA3) wurde nach Herstellerangaben mit BamHI und EcoRI inkubiert. Die Oligonukleotide wurden nach Herstellerangaben hybridisiert und phosphoryliert und zusammen mit dem geschnittenen Zielvektor und der geschnittenen mASA ligiert. In Abbildung 8.2 ist das daraus resultierende Plasmid sowie eine schematische Darstellung des Fusionskonstruktes





mASA-2 x Strep (durchgezogene Linie) zu sehen. ASA-Dimere waren im Fall der rhASA bei pH 5 nicht und bei mASA-2 x Strep nur sehr gering vorhanden.

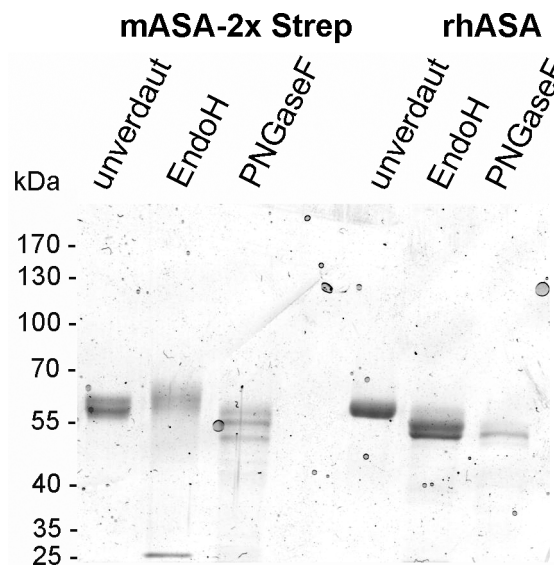


**Abbildung 8.3:** Gelfiltration von mASA-2x Strep zur Ermittlung der Oktamerisierungsfähigkeit.

rhASA (gestrichelte Linie) bzw. mASA-2x Strep wurden bei pH 7,4 und pH 5 durch Gelfiltration aufgetrennt. Dargestellt sind die Elutionsprofile von rhASA (rot) und mASA-2 x Strep (schwarz). 8n = Oktamer, 2n = Dimer.

## Glykosylierung

Die Glykosylierung ist für die lysosomale Sortierung der ASA unabdingbar. WT-hASA besitzt drei Asn-Reste, an denen hauptsächlich Glykosylierungen des mannosereichen N-Glykan Typs vorkommen [108]. Zum Vergleich der Glykosylierung von mASA-2 x Strep und rhASA wurden die rekombinanten Proteine mit den Enzymen EndoH, welche mannosereiche N-gebundene Oligosaccharide abspaltet, und PNGase F, welche sowohl mannosereiche als auch hybride und komplexe N-gebundenen Oligosaccharide abspaltet, behandelt. Je 1  $\mu$ g behandelter und unbehandelter ASA wurden elektrophoretisch aufgetrennt und mit Coomassie-Lösung angefärbt.



**Abbildung 8.4: Deglykosylierung von mASA-2 x Strep und rhASA mit EndoH und PNGase F.**

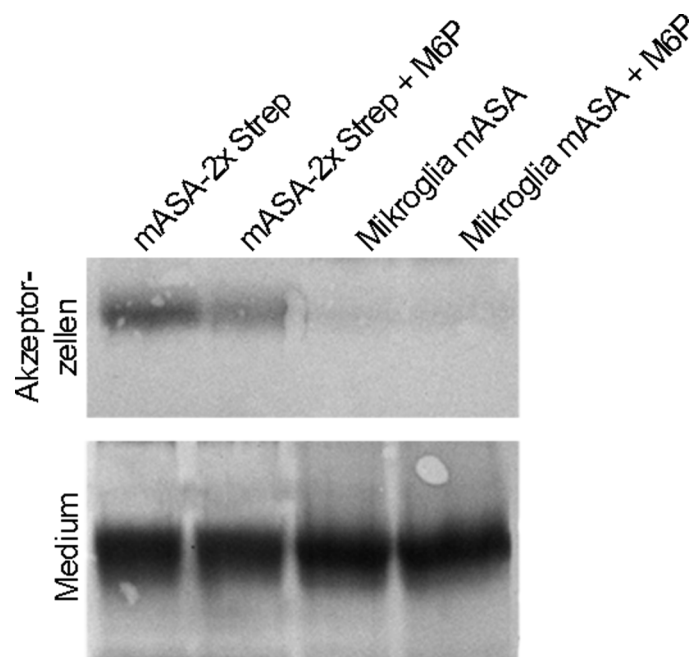
Zur Abspaltung von N-Glykanen wurden sowohl mASA-2 x Strep als auch rhASA mit EndoH bzw. PNGase F inkubiert und anschließend elektrophoretisch aufgetrennt. Als Vergleich wurden mASA-2 x Strep und rhASA ohne EndoH oder PNGase F unter sonst gleichen Bedingungen behandelt. Die Proteine im Gel wurden mit Coomassie-Lösung sichtbar gemacht. Die Bande bei etwa 25 kDa stammt von der EndoH. Bei Behandlung von mASA-2 x Strep ist eine Größenabnahme von ca. 4,6, 7,7 und 13,8 kDa nach PNGase F-Behandlung zu erkennen. Bei rhASA sieht man sowohl nach EndoH- als auch nach PNGase F-Behandlung eine Größenabnahme von ca. 4,2 kDa.

Nach Behandlung mit EndoH war das Molekulargewicht von rhASA um 4,2-4,9 kDa erniedrigt (siehe Abb. 8.4). So auch nach Behandlung mit PNGase F, da rhASA ausschließlich mannosereiche N-Glykane besitzt. Bei mASA-2 x Strep waren schon im unbehandelten Zustand zwei Banden zu erkennen. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um mASA-2 x Strep (ca. 65,6 kDa) und mASA mit abgespaltenem Tag (ca. 60,7 kDa). Nach EndoH Behandlung konnte für mASA-2 x Strep keine Größenverschiebung festgestellt werden, es sind aber, wie bei unverdauter mASA-2 x Strep, zwei Banden zu erkennen. Wurde diese dagegen mit PNGase F behandelt, konnte eine Größenabnahme von ca. 4,6-13,8 kDa detektiert werden. Dabei handelt es sich wahrscheinlich mASA-2 x Strep mit zwei (ca. 61 kDa), einer (ca. 57,9 kDa) und keiner (ca. 51,8 kDa) Glykosylierung.

## 8.2 Transfer radioaktiv markierter ASA in einer Ko-Kultur

Sowohl EET als auch KMT beruhen auf dem Prinzip der Kreuzkorrektur zwischen Zellen. Um dies zu Überprüfen wurde ein erstes Experiment (n = 1) durchgeführt. Dabei wurde die Aufnahmefähigkeit von mASA aus Mikroglia (Donorzellen), in ASA-defiziente Fibroblasten (Ak-

zeptorzellen), getestet. Zur Durchführung dieses Versuches wurde das in Muschol *et al* 2002 publizierte Protokoll modifiziert [83] und ist hier nur kurz beschrieben.



**Abbildung 8.5: Radioaktiver Transferversuch von markierter mASA aus Zellkulturüberständen.**

ASA-defiziente Fibroblasten dienen als Akzeptorzellen und wurden  $\mu$ N mit metabolisch markierter mASA aus Zellkulturüberständen mASA-2 x Strep überexprimierender CHO-S-Zellen bzw. primären Mikroglia aus WT-Mäusen gefüttert. Zur Konkurrenz des MPR300 wurde M6P hinzugegeben. Die Akzeptorzellen wurden nach Inkubation homogenisiert und die endozytierte mASA immunpräzipitiert. Nach Durchführung einer SDS-PAGE wurde die endozytierte mASA autoradiographisch detektiert. In Reihe eins und zwei sind mit mASA-2 x Strep aus CHO-S-Zellkulturüberständen, mit und ohne M6P gefütterte Akzeptorzellen, gezeigt. In Reihe drei und vier sind mit mASA aus primären Mikroglia-Zellkulturüberständen, gewonnen aus WT-Mäusen, mit und ohne M6P gefütterte Akzeptorzellen gezeigt. Die Endozytose von mASA-2 x Strep in Akzeptorzellen ließ sich nicht komplett durch M6P hemmen (Reihe zwei). mASA aus primären Mikroglia wurde nicht von Akzeptorzellen endozytiert (Reihe drei und vier). In dem Medium der Akzeptorzellen konnten identische Mengen an mASA detektiert werden (unten). (n = 1)

Dazu wurden die Akzeptorzellen mit mASA, von mASA-2 x Strep überexprimierenden CHO-S-Zellen bzw. von primären Mikroglia aus WT-Mäusen, wie in Kapitel 4.3.7 mit und ohne Zugabe von M6P, gefüttert. Die mASA der Donorzellen wurde zunächst metabolisch mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin/Cystein markiert, anschließend die Proteine des konditionierten Mediums gefällt und die Akzeptorzellen mit identischen mASA-Aktivitäten (0,65 mU mASA) inkubiert. Die Akzeptorzellen wurden, nach Inkubation, homogenisiert und die aufgenommene mASA immunpräzipitiert. Für die Immunpräzipitation wurde ein von Pineda generiertes Antiserum gegen mASA-His/Strep (siehe Kap. 8.1) verwendet. Anschließend wurde eine SDS-PAGE mit autoradiographischer Detektion der mASA aus den Zellhomogenaten durchgeführt (siehe Abb. 8.5). Die von ASA-defizienten Fibroblasten endozytierte mASA-2 x Strep aus CHO-S-Zellen ist in Reihe eins

und zwei zu sehen. Diese Aufnahme ließ sich durch die Zugabe von M6P nur teilweise inhibieren (Reihe zwei). In Reihe drei und vier konnte nur ein sehr schwaches Signal detektiert werden, was darauf hindeutet, dass mASA von primären Mikroglia aus WT-Mäusen von den Akzeptorzellen nicht endozytiert wurde. Die detektierte mASA im Medium von Zellkulturüberständen der gefütterten Akzeptorzellen zeigt, dass für jede Bedingung identische Mengen an mASA eingesetzt wurden. Arbeiten mit Radioaktivität wurden von Dr. Ulrich Matzner durchgeführt.

# Lebenslauf

## Debora Kaminski

Adresse: Schieffelingsweg 28  
53123 Bonn

Telefon: 0163/3645263

E-Mail: Debora.Kaminski@gmx.de

Geboren am: 19. Juli 1983

Ort: Bonn

Familienstand: Verheiratet

Nationalität: Deutsch

## Schule & Studium

1989 – 1994 Marienschule in Bonn

1994 – 2003 Integrierte Gesamtschule Bonn Beuel

2003 Abitur

2003 – 2009 Studium der Biologie  
an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

2008 – 2009 Diplomarbeit am Institut für Physiologische Chemie der Rheinischen  
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn: „Immunzytochemische Charakteri-  
sierung von Sulfatid in Oli-neu Zellen“

10.2009 Diplom Biologie

ab 02.2010 Promotionsvorhaben am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn



# Publikationen

**Efficacy of enzyme replacement therapy in an aggravated mouse model of metachromatic leukodystrophy declines with age.** Matthes F, Stroobants S, Gerlach D, Wohlenberg C, Wessig C, Fogh J, Gieselmann V, Eckhardt M, D’Hooge R, Matzner U. *Hum Mol Genet.* 2012 Jun.

**Intracerebroventricular enzyme infusion corrects central nervous system pathology and dysfunction in a mouse model of metachromatic leukodystrophy.** Stroobants S, Gerlach D, Matthes F, Hartmann D, Fogh J, Gieselmann V, D’Hooge R, Matzner U, *Hum Mol Genet.* 2011 Jul.

**Nanofibers in a hyaluronan-based pericellular matrix.** Gerlach D, Kaminski T, Pérez-Willard F, Kirfel G, Gieselmann V, Kappler J. *Matrix Biol.* 2010 Oct;29.

## Posterbeiträge

**Intracerebroventricular enzyme infusion corrects central nervous system pathology and dysfunction in a mouse model of metachromatic leukodystrophy.** *ESGLD 2012, Helsinki*

## Auszeichnung

Young Scientist Award *ESGLD 2012, Helsinki*





# Erklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Dissertation, einschließlich aller Abbildungen und Grafiken, selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen verwendet habe. Ferner erkläre ich, die von mir vorgelegte Dissertation an keiner anderen Hochschule eingereicht zu haben.

Bonn, Juni 2014

Debora Kaminski



# Danksagung

Als Erstes bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Volkmar Gieselmann für die Überlassung dieses interessanten Themas.

Bei Prof. Dr. Walter Witke möchte ich mich für die freundliche, unkomplizierte Übernahme des Koreferats bedanken.

Ein herzliches Dankeschön auch an Dr. Gregor Kirfel für die prompte Bereitschaft als fachnaher Prüfer zur Verfügung zu stehen

Dr. Ulrich Matzner danke ich für seine Betreuung und seine immer fortwährenden, neuen Ideen.

Prof. Dr. Dieter Hartmann möchte ich für seine Anleitung zur zerebralen Orientierung danken. Angelika und Birgit danke ich für die netten Stunden am Vibratom.

Stijn Stroobants (Labor für Biologische Psychologie der Universität Leuven) danke ich für die hervorragende Anweisung zur Implantation der osmotischen Minipumpen sowie die Durchführung und Auswertung der Verhaltensanalysen.

Den Firmen Shire Human Genetic Therapies und Zymenex A/S sei für die großzügige Bereitstellung rekombinanter humaner ASA gedankt.

Allen Mitarbeitern und ehemaligen Mitarbeitern der AG Gieselmann möchte ich für die unglaublich kollegiale und vor allem freundschaftliche Atmosphäre danken. Isi, Carmen, Angela, Karoli, Nobbi, Zwiebelchen, Anne, allen Bewohnern unseres Doktoranden Brutschrankes, und so vielen mehr, ihr habt den Arbeitsalltag zu etwas ganz besonderem gemacht. Meiner Schwester im Herzen und der Frisur Katy, möchte ich für ihre ehrliche Art, ein immer offenes Ohr und den, wenn fällig, ordentlichen Tritt in den Hintern, danken.

Der ganzen AG-Matzner möchte ich für die immer fortwährende Hilfsbereitschaft danken. Danke Claudia, Heidi äähm Monika, Annika, Tilman, Axel und Frank, auch für das Schwätzchen zwischendurch, was doch für manch wunderschönen Lachkrampf gesorgt hat. Außerdem möchte ich besonders Tilman für sein geduldiges Korrigieren meiner „Werke“, seiner Unterstützung für so vieles und die Entstehung einer wundervollen Freundschaft danken!

Abschließend bedanke ich mich bei meiner immer größer werdenden Familie. Meinen wundervollen Eltern danke ich für einfach Alles!!! Schwiegerhexi, Kai und Stau für die liebevolle Aufnahme in ihre Familie. Und natürlich bei Oma, Opa, Tantilein, Anhängseln und Sprösslingen, ich kann immer uneingeschränkt auf euch zählen! Dem besten Ehemann von der Welt danke ich für seine nie endende Geduld, seine liebevolle Art mich auf Fehler hinzuweisen, sowie seine fortwährende Bereitschaft mir, trotz meiner Meckereien, immer wieder zu Helfen.